

FACULDADE CENECISTA DE BENTO GONÇALVES

FACULDADE DE BIOMEDICINA

ELISA FRARE



**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS
DE UVA MERLOT DE PARREIRAIS DE SANTANA DO LIVRAMENTO
– RS.**

MONOGRAFIA

BENTO GONÇALVES

2016

ELISA FRARE



**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS
DE UVA MERLOT DE PARREIRAIS DE SANTANA DO LIVRAMENTO
– RS.**

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da professora Dra. Crislaine Aparecida Paludo (FACEBG) e Co-orientação do Dr. Gildo Almeida da Silva (EMBRAPA).

BENTO GONÇALVES

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me dado força em todos os momentos e principalmente nas dificuldades.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial ao Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV) pela oportunidade.

Ao pesquisador Doutor Gildo Almeida da Silva co-orientador desta monografia, de caráter inigualável, agradeço por ter me colhido de braços abertos me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com muita paciência e maestria. Por todo seu conhecimento científico compartilhado, confiança, diversão e entusiasmo passado durante o estágio obrigatório e realização desta monografia.

À equipe do laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, Doutora Bruna Carla Agustini e Bsc. Maria Antonieta Luvison Morini.

Às acadêmicas que conheci durante a realização deste trabalho, Juliana Hatsue Inoue, Larissa de Bona Gambin e Mariana Ritter Rau pelos momentos compartilhados, descontrações, companheirismo, amizade e auxílio na realização das atividades.

À todos os colegas e amigos de faculdade que sempre estiveram ao meu lado, em especial a Daieli M. Santin, Patrícia Bonatto dos Santos, Rosebel Ritter, Elizete Zardo e Camila Jorge.

À Rodrigo Tusset, pelo apoio na realização desta monografia. Obrigada pela paciência, carinho e companheirismo ao longo desta trajetória.

Aos meus irmãos Lucas Romano Frare, Matheus Augusto Frare e minha cunhada, Caroline Farias de Lima que sempre me incentivaram durante este período.

Aos meus pais, Ailton Antônio Frare e Ana Luísa da Silva Frare, obrigada por todos os incentivos e conselhos compartilhados, apoio incondicional e por acreditarem em meus sonhos.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.” Isaac Newton.

Para tudo há um tempo determinado [...] Tempo de plantar e tempo de colher o que se plantou. Eclesiastes 3:1

RESUMO

A qualidade de um bom vinho não é dependente apenas da matéria-prima empregada, a uva, mas também das leveduras utilizadas no processo de vinificação, sendo uma das etapas mais importantes para a elaboração de vinhos, o uso de leveduras selecionadas com aptidão enológica adequada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a aptidão enológica de linhagens de leveduras isoladas em um parreiral de Santana do Livramento – RS (localidade - 30.444921S. 55.251420 O). As linhagens foram avaliadas quanto à velocidade de fermentação, produção de sulfeto de hidrogênio, produção de fator *killer*, sensibilidade a este fator e neutralidade à toxina *killer*. A avaliação da capacidade fermentativa foi realizada em meio Mosto Sulfito e a característica *killer* e sensibilidade foram realizadas em meio sólido Mosto Lorena/ELNC 80:20. As linhagens que apresentaram comportamentos distintos foram identificadas por amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 por PCR e RFLP. Os resultados mostraram que dentre as 50 linhagens isoladas, nenhuma apresentou boa capacidade fermentativa, 12% produziram altas concentrações de sulfeto de hidrogênio e quanto à característica *killer* nenhuma das linhagens demonstrou ser positiva, 30% apresentaram característica sensível e 70% caráter neutro à toxina. A maior incidência de leveduras identificadas corresponderam ao gênero *Issatchenkia*.

Palavras-chave: Aptidão enológica, seleção de leveduras, *killer*.

ABSTRACT

The quality of a good wine is not only dependent on the raw material used, the grape but also the yeast employed in winemaking, one of the most important steps for the preparation of wine is the use of selected yeast with oenological skills. This study aimed to assess the oenological fitness of isolated yeast strains of a vineyard of Santana do Livramento - RS (location - 30.444921S 55.251420 W). The strains were evaluated for speed of fermentation, production of hydrogen sulphide, killer factor formation, sensitivity to this factor and neutrality to the killer toxin. The evaluation of the fermentative capacity of 50 strains was held with Sulphite Must Medium and the killer feature and sensitivity were carried out in Must Lorena/ELNC 80:20 Solid Medium. The strains that showed distinct behaviours were identified by amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region by PCR and RFLP. The results showed that none of isolated yeasts, showed both good fermentative capacity and killer characteristics, 70% were neutral and 12% produced high concentrations of hydrogen sulphide. The highest incidence of yeast identified corresponded to *Issatchenkia*.

Keywords: grapes, yeasts, biodiversity, *Vitis vinifera*, selection of yeast, killer winemaking skill.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção de vinhos em nível mundial.....	14
Figura 2: Uvas para processamento de finos vinhos nas regiões brasileiras	16
Figura 3: Uva Merlot.....	18
Figura 4: Via metabólica da produção de etanol	20
Figura 5: Via metabólica para produção de H ₂ S	21
Figura 6: Sequência de aminoácidos da toxina <i>killer</i>	25
Figura 7: Ciclos de replicação do L-dsRNA e M-dsRNA	26
Figura 8: Região do rDNA com o espaço interno transcrito (ITS)	28
Figura 9: Leveduras da série MSCSL15 em Mosto Ágar	29
Figura 10: Suspensões de células	30
Figura 11: Fitas de acetato de chumbo	30
Figura 12: Tubos utilizados no teste de fermentação.....	32
Figura 13: Cuba de eletroforese e fonte utilizados na PCR e RFLP.	34
Figura 14: Velocidade de fermentação da linhagem 29MSCSL15 e dos padrões 1 VVT e K1	37
Figura 15: Leveduras produtoras de H ₂ S	39
Figura 16: Nível de produção de H ₂ S das linhagens isoladas da cultivar Merlot.....	41
Figura 17: Linhagens MSCSL15 e padrões <i>killer</i> do laboratório, no meio Mosto 80:20	42
Figura 18: Linhagens sensíveis da série MSCSL15.....	43
Figura 19: Leveduras utilizadas no teste de sensibilidade	44
Figura 20: Linhagens MSCSL15 sensíveis às linhagens testadas	45
Figura 21: Linhagens MSCSL15 não-sensíveis às linhagens testadas.....	46
Figura 22: Gel com perfis de fragmentação das linhagens da série MSCSL15	47
Figura 23: Gel com perfis de fragmentação das linhagens da série MSCSL15	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de uvas no Brasil, em toneladas.	17
Tabela 2: Classificação das leveduras <i>killer</i> , baseada nos padrões de atividade e sensibilidade às toxinas	24
Tabela 3: Condições das enzimas de restrição.....	35
Tabela 4: Produção de H ₂ S da Série MSCSL15	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina Trifosfato.

CNPUV: Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho.

DNA: Ácido ribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*).

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*).

ENLC: Extrato de levedura não comercial.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

DO: Denominação de Origem.

DsRNA: Ácido ribonucleico de fita dupla.

Haelll: *Haemophilus aegyptius*.

Hinfl: *Haemophilus influenza*.

H₂S: Sulfeto de hidrogênio.

IP: Indicação de Procedência.

ITS: Espaçadores transcritos internos (do inglês, *internal transcribed spacer*).

MALDI-TOF/MS: espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*).

Mbol: *Moxarella bovis*.

Mg: miligrama.

mL: mililitro.

MSCSL15: Merlot Santa Colina Santana do Livramento 2015.

pb: Pares de bases.

PCR: Reação em cadeia de polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*).

RFLP: Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*).

rDNA: DNA ribossomal.

rRNA: RNA ribossomal.

RNA: Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*).

TBE: solução tamponante Tris-borato-EDTA.

µL: microlitro.

UV: Ultravioleta.

VLP: Partículas semelhantes a vírus (do inglês, *virus-like particle*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 HISTÓRIA DA VINIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE UVAS	15
3.2 CULTIVAR MERLOT	17
3.3 LEVEDURAS	18
3.4 FERMENTAÇÃO	19
3.5 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO	21
3.6 CARACTERÍSTICA <i>KILLER</i> EM LEVEDURAS	23
3.7 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS, PRESERVAÇÃO E REPICAGEM	29
4.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE CÉLULAS	29
4.3 PREPARO DAS FITAS IMPREGNADAS COM ACETATO DE CHUMBO 3%	30
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H ₂ S)	31
4.5 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO	31
4.6 ATIVIDADE <i>KILLER</i>	32
4.6.1 Avaliação da capacidade <i>killer</i>	32
4.6.2 Avaliação da sensibilidade ao fator <i>killer</i>	32
4.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS MSCSL15	33
4.7.1 Extração do material genômico	33
4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	34
4.7.3 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)	35
4.7.4 Abreviação de gêneros	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO	37
5.2 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO	38
5.3 LINHAGENS <i>KILLER</i>	41
5.4 LINHAGENS SENSÍVEIS E NEUTRAS	43
5.5 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS	46

6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	66
ANEXO A - Meios de Cultura	66
1. Meio Mosto Ágar	66
2. Meio Mosto Sulfito.....	66
3. Meio Ágar Mosto Lorena/ELNC 80:20.	66
ANEXO B - Composição da reação de PCR	68

1. INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira é uma atividade importante para a sustentabilidade de emprego e grandes empreendimentos no Brasil, onde tem oportunizado o aumento na economia, por meio do turismo e da gastronomia. O estado do Rio Grande do Sul, especificamente a Serra Gaúcha é a região responsável por cerca de 90% da produção total de vinhos no Brasil, obtendo destaque para produção de uvas americanas, seja, para consumo *in natura*, vinhos de mesa ou para produção de sucos; desta forma é a maior e mais importante região vinícola do Brasil (MELLO, 2015; 2011).

Sabe-se que as videiras possuem características únicas que estão diretamente associadas à área geográfica (latitude e altitude). Tais traços associados aos demais fatores, como o solo e o vento, influenciam diretamente o vinho, modificando a cor, o aroma, a textura, o sabor e o brilho, expressando desta forma o produto. Assim, vinhos produzidos em diferentes regiões, elaborados a partir de uma mesma cultivar e técnica apresentam resultados distintos, conferindo características únicas ao produto final. É justamente por isso, que os locais podem receber as Indicações Geográficas (IG) (PEREIRA, 2008; TONIETTO, 1993). As Indicações Geográficas, no Brasil, são subdivididas em duas modalidades: Denominação de Origem (DO) e Indicação de Procedência (IP). A primeira se refere a um produto ou serviço que possui características exclusivas que se devem ao meio geográfico, incluindo os fatores humanos e naturais. Diferentemente da DO, a IP é fornecida a um país, estado, cidade ou região quando se torna conhecida como centro de produção de determinado produto (APROVALE, 2015; TONIETTO, 2014).

Na busca de reconhecimento para vinhos de qualidade, o estado do Rio Grande do Sul colocou em andamento projetos para o reconhecimento oficial das Indicações de Procedência e Denominação de Origem no estado. Atualmente, o RS conta com cinco Indicações Geográficas para vinhos finos. As regiões que possuem Indicação de Procedência são: Vale dos Vinhedos (recebida em 2002), Pinto Bandeira (em 2010), Altos Montes (em 2012), Monte Belo do Sul (em 2013) e recentemente Farroupilha (em 2015). A denominação de origem foi fornecida ao Vale dos Vinhedos, em 2012. As regiões da campanha gaúcha e Vale do Submédio São Francisco na Bahia estão em fase desenvolvimento da IG (EMBRAPA, 2015; 2013).

O Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV), localizado em Bento Gonçalves, é uma unidade descentralizada da EMBRAPA, sendo a pioneira no tema das IG, relacionado com vinho, no Brasil. Iniciou os projetos nos anos 90, e o desenvolvimento das Indicações Geográficas contribuiu para o mercado consumidor e a qualidade dos vinhos, gerando um diferencial para produtores e vinícolas da região (EMBRAPA, 2013).

As leveduras desempenham papel importantíssimo para a elaboração de vinhos, sabe-se que elas são as responsáveis pela conversão do açúcar presente no mosto em álcool, e o resultado deste processo está diretamente relacionado à linhagem de levedura empregada. A utilização de leveduras selecionadas com características desejáveis oferece uma série de vantagens para elaboração de vinhos, como capacidade fermentativa, baixa produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (da SILVA & SILVA, 1987) e neutralidade ao fator *killer* (da SILVA, 1996), conferindo qualidade superior ao produto final.

Atualmente a cultivar Merlot ocupa o primeiro lugar em volume de produção de uvas entre as cultivares *Vitis vinifera* tintas no Rio Grande do Sul, devido à atual importância da cultivar Merlot para o estado do Rio Grande do Sul e região da Campanha, o presente estudo está voltado para a caracterização do perfil enológico de leveduras obtidas de uvas da cultivar Merlot pertencente à vinícola Santa Colina, situada no município de Santana do Livramento-RS.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar perfil enológico de cinquenta linhagens de levedura isoladas da cultivar Merlot de um parreiral cujas coordenadas são: - 30.444921S. 55.251420 O, no município de Santana do Livramento - RS, pertencentes à vinícola Santa Colina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a habilidade fermentativa;
- b) Avaliar a capacidade produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S);
- c) Avaliar a capacidade do fator *killer*;
- d) Avaliar a sensibilidade ao fator *killer*;
- e) Analisar a neutralidade ao fator *killer*;
- a) Identificar genotipicamente as leveduras amplificando a região ITS1-5.8-ITS2 do rDNA com os *primers* ITS2 e ITS4 e ainda empregando as enzimas de restrição *Hinfl*, *HaeIII* e *MbolI* no processo de PCR-RFLP.

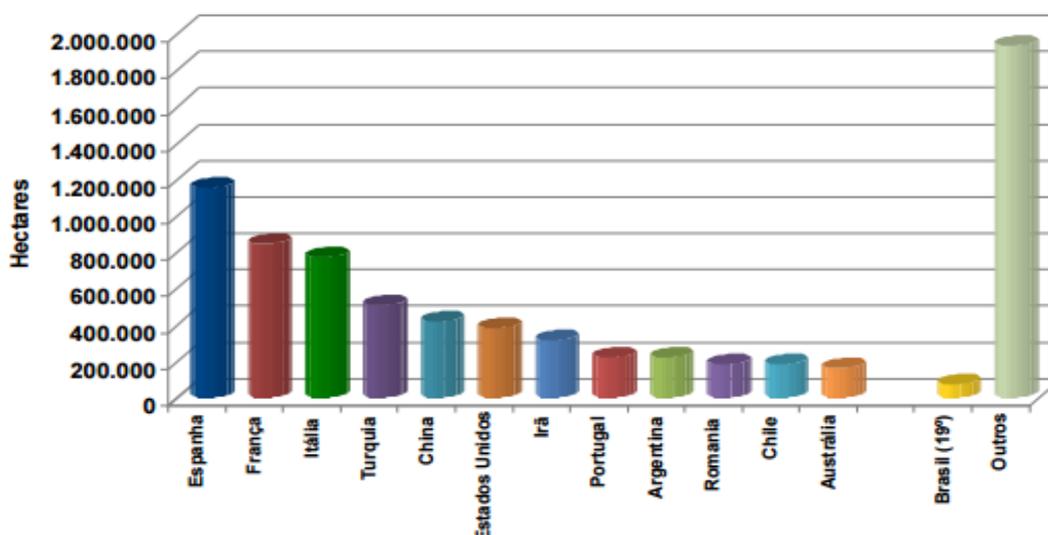
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A videira é uma planta da família Vitaceae, sarmentosa com caule lenhoso trepador. Sua família possui diversos gêneros, destacando-se o *Vitis* que contém onze gêneros vivos, com cerca de 600 espécies e dois gêneros fósseis. Cada uma destas espécies possui diversas variedades chamadas de cultivares ou castas, podendo ser agrupadas em: europeias, americanas e híbridas. As videiras europeias, compreendem as cultivares com melhor qualidade, são consideradas plantas exigentes e utilizadas no processo de vinificação para a elaboração de vinhos finos, alguns exemplos de cultivares são: Merlot, Chardonnay e Cabernet Sauvignon (TECCHIO, 2015; GIOVANNINI, 2014).

Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de uvas no ano de 2014 foi de 1.437.245 toneladas, dos quais 19,3 milhões de litros de vinhos foram comercializados no Rio Grande do Sul e 2.324.029 milhões de litros de vinhos de mesa foram exportados (IBRAVIN, 2015; IBGE, 2015).

Em nível mundial, o Brasil figura em 19º lugar dos países que produzem vinhos, conforme figura 1 (MELLO, 2009). A produção de vinhos no Brasil concentra-se principalmente no estado do Rio Grande do Sul, com aproximadamente 90% da produção total, é também o estado que contém as principais entidades ligadas à busca por melhoria da qualidade do vinho (HOECKEL *et al.*, 2013).

Figura 1: Produção de vinhos em nível mundial.



Fonte: MELLO, 2009.

3.1 HISTÓRIA DA VINIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE UVAS

As sementes de uvas mais antigas foram encontradas por arqueologistas durante escavações feitas nas cidades de Catal Hüyük na Turquia, em Damasco na Síria, Byblos no Líbano e na Jordânia cerca de 8.000 a.C, não podendo ser apontado precisamente a época e o local onde foi elaborado pela primeira vez o vinho (JOHNSON, 1989).

No Brasil, a história da produção de uvas e vinhos começou por meio da expedição portuguesa. As primeiras videiras foram trazidas por Martin Afonso de Souza, no ano de 1532, eram mudas de uvas finas do tipo *Vitis vinifera*. As primeiras mudas foram plantadas na capitania de São Vicente, no sudeste do país, atualmente representada pelas cidades de Bertioga (SP) a Cananéia/Ilha do Mel (PR) e devido à condições desfavoráveis do clima e solo, a produção de uvas foi impedida. Porém Brás Cubas, membro da expedição colonizadora de Martin Afonso de Pena, transferiu a produção de uvas do litoral para o Planalto Atlântico, e em 1551 conseguiu elaborar o primeiro vinho brasileiro (IBRAVIN, 2015; CAMARGO *et al.*, 2010).

No estado do Rio Grande do Sul, o histórico de produção de uvas e vinhos possui ligação direta com a colonização italiana, estabelecida no estado a partir de 1875. Devido a condições ambientais, até meados dos anos 70, a vitivinicultura era baseada quase que exclusivamente em variedades americanas (Isabel - *Vitis labrusca*) e híbridas interespecíficas, apesar do empenho de algumas vinícolas tradicionais da Serra Gaúcha na produção de uvas viníferas. Na segunda metade da década de 70, por meio de investimentos estrangeiros, começa a consolidação de uma nova viticultura gaúcha, voltada à produção de vinhos finos (figura 2) e espumantes na região da Serra Gaúcha e após na região da Campanha (IBRAVIN, 2015; CAMARGO *et al.*, 2010).

A viticultura na região da Campanha Gaúcha tem como marco referencial o estudo de zoneamento vitícola, na década de 70. O primeiro empreendimento foi concretizado com a implantação dos vinhedos no município de Santana do Livramento. A vinícola Santa Colina é um projeto de um grupo japonês que implantou os vinhedos e sua própria vinícola (IBRAVIN, 2015; CAMARGO *et al.*, 2010).

Figura 2: Uvas para processamento de finos vinhos nas regiões brasileiras



Fonte: EMBRAPA, 2010 modificado pelo autor.

A produção de uvas finas para elaboração de vinhos está basicamente concentrada nas regiões de clima temperado do Sul do país, embora a vitivinicultura esteja em processo de expansão para novas áreas. Atualmente o Brasil figura como o quinto maior produtor de vinhos no Hemisfério Sul e o mercado de vinhos finos no Brasil corresponde a cerca de 20% da comercialização de vinhos no país (IBRAVIN, 2015; EMBRAPA, 2010). A tabela 1 demonstra a produção de uvas no Brasil, nos anos de 2008 a 2012.

Tabela 1: Produção de uvas no Brasil, em toneladas.

Estado	Ano				
	2008	2009	2010	2011	2012
Pernambuco	162.977	158.515	168.225	208.660	224.758
Bahia	101.787	90.508	78.283	65.435	62.292
Minas Gerais	13.711	11.773	10.590	9.804	10.107
São Paulo	184.930	177.934	177.538	177.227	176.902
Paraná	101.500	102.080	101.900	105.000	70.500
Santa Catarina	58.330	67.546	66.214	67.767	70.909
Rio Grande do Sul	776.027	737.363	692.692	829.589	840.251
Brasil	1.399.262	1.345.719	1.295.442	1.463.481	1.455.809

Fonte: MELLO (2012).

3.2 CULTIVAR MERLOT

Originária de Médoc, na França, Merlot é uma cultivar de uva fina (*Vitis vinifera*) que origina um vinho de alta qualidade consagrado como varietal. É utilizado também para mesclar vinhos juntamente com outras cultivares do grupo de uvas europeias, como de Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e de outras castas de renome (EMBRAPA, 2003). No Brasil, foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul pela estação agrônômica de Porto Alegre, onde foi difundida para a região da Serra Gaúcha, e a partir de 1970 começou a ser plantada em maiores quantidades (RIZON & MIELE, 2003).

O vinho obtido da cultivar Merlot possui um aspecto visual distinto, apresenta coloração vermelho-violáceo, variando a intensidade conforme a safra. Na degustação, apresenta caráter macio, equilibrado e sem ser encorpado, destaca-se mais pelo gosto e aspecto do que pelo seu aroma (RIZON & MIELE, 2003).

Atualmente, a cultivar Merlot (figura 3) ocupa o primeiro lugar em volume de produção de uvas entre as cultivares *Vitis vinifera* tintas no Rio Grande do Sul e segundo lugar no total de uvas viníferas produzidas no estado. Os municípios que possuem maior produção desta cultivar são: Bento Gonçalves, Monte Belo do Sul,

Farroupilha, Garibaldi e Santana do Livramento. Em 2015, foram produzidos 8.010.816 kg da cultivar no estado (Comunicação pessoal com IBRAVIN, 2015).

Figura 3: Uva Merlot



Fonte: Disponível em < <http://www.guiadovinho.com.br/leiamais.php?id=104>>. Acesso em 20/11/2015.

3.3 LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares amplamente distribuídos pela natureza. Podem apresentar células com formatos esféricos, globosos, alongados, ovoides, esferoidais, elipsoidais ou até mesmo bizarros, como *Nematospora coryli* (VAN RIJ, 1984). Na presença de oxigênio respiram aerobicamente formando dióxido de carbono e água e na ausência de oxigênio fermentam hidratos de carbono e desta maneira produzem etanol e dióxido de carbono (TORTOTA *et al.*, 2012).

As leveduras são os agentes transformantes do açúcar em álcool. O emprego de leveduras selecionadas, com características próprias para a produção de determinado tipo de vinho, oferece uma série de vantagens, tais como: fermentação completa e regular, maior produção de álcool, produção controlada de acidez volátil, possibilidade de uma clarificação mais rápida do vinho e melhoria da sua estabilidade biológica, podendo contribuir para a qualidade do produto final, além de

conferir aromas agradáveis e ao mesmo tempo contribuir para a complexidade do vinho, que é única para uma determinada região (JIMENEZ *et al.*, 2004; da SILVA & SILVA, 1987).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a principal representante e responsável pela transformação do mosto em vinho. Embora seja a mais importante levedura envolvida na produção de vinhos, ela pode estar presente em pequeno número nos vinhedos e nas bagas íntegras de uva. Este fato faz com que a fermentação se inicie com leveduras autóctones não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Nas etapas mais tardias da fermentação, a espécie *Sacch. cerevisiae* assume o processo fermentativo e torna-se prevalente (VIEL, 2009; da SILVA, 2003).

Um vinho com boa qualidade jamais será produzido sem algum agente transformante e sem uva de qualidade. O processo de seleção da levedura deve ser criterioso, pois mesmo uma levedura sendo *Sacch. cerevisiae*, pode não apresentar aptidão enológica, ou seja, pode produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), não ser resistente ao SO_2 adicionado e nem mostrar neutralidade em relação ao fator *killer* (da SILVA, 2003; 1996).

3.4 FERMENTAÇÃO

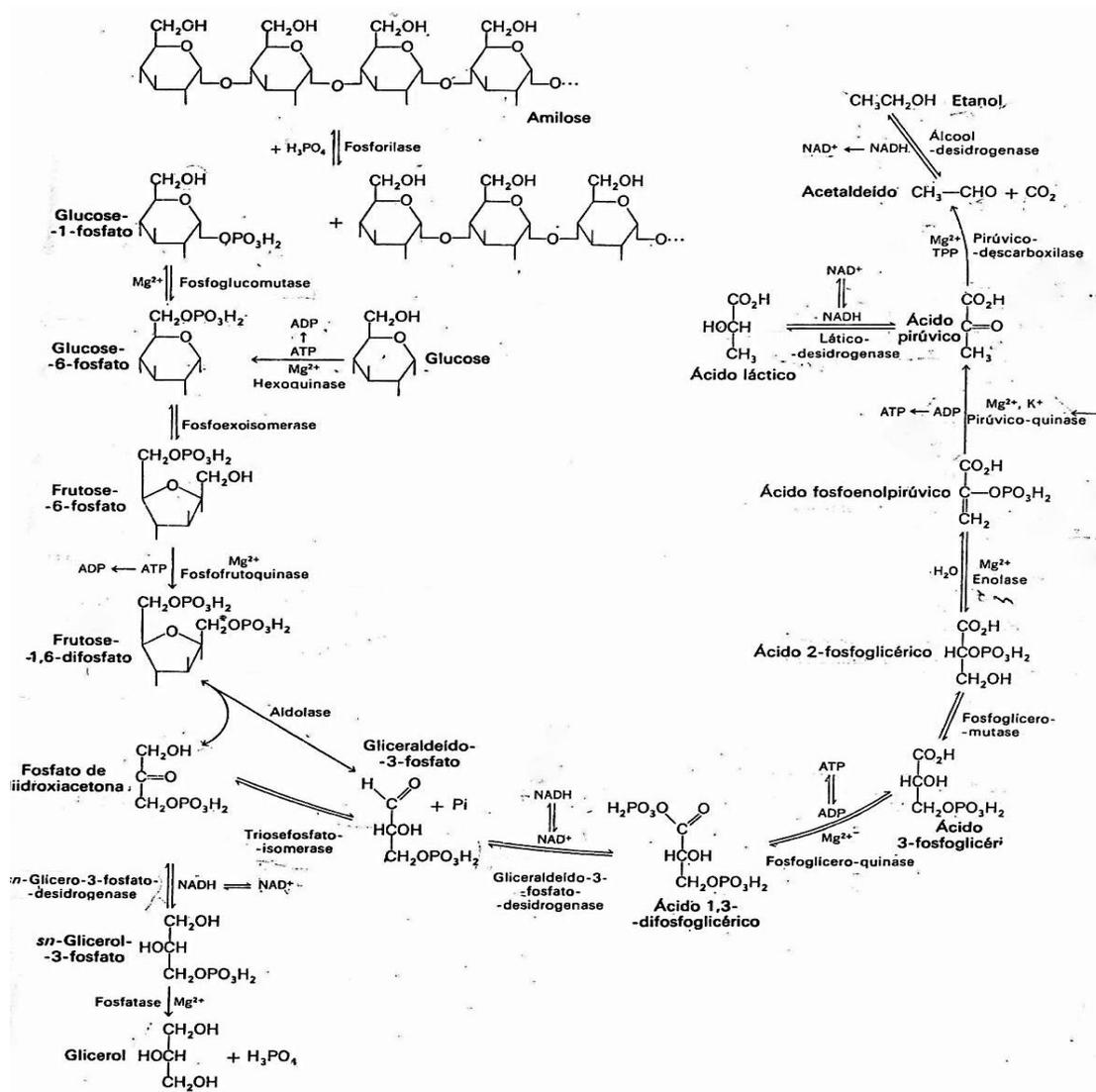
No processo de fermentação do vinho os dois principais carboidratos presentes no mosto de uva, glicose e frutose, são transformados em etanol e gás carbônico. A disponibilidade de glicose e frutose no mosto de uva geralmente se equivalem na questão de quantidade, embora a *Saccharomyces cerevisiae* seja conhecida por exibir uma preferência pela glicose (BERTHELIS, 2004).

A transformação de carboidratos (sacarose, glicose, frutose, manose e galactose) até resultar etanol e gás carbônico envolve uma sequência ordenada de doze reações, exercido pelo metabolismo anaeróbico dos carboidratos, ou seja, a glicólise (figura 4). O produto final da glicólise é o ácido pirúvico, na fermentação alcoólica, o ácido pirúvico é convertido a acetaldeído e encaminhado pela via glicolítica para produção de etanol. Cada reação do processo é realizada por enzimas específicas, e estas sofrem a ação de diversos fatores como, por exemplo: nutrientes, minerais, vitaminas, pH, temperatura; alguns destes fatores estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo (CONN & STUMPF, 1975).

No resultado final da fermentação do mosto de uva ocorre a produção de uma série de compostos, mas o etanol é o produto principal. Esses compostos são liberados para o meio e contribuem para o sabor do vinho, de modo que a qualidade do vinho depende do tipo de compostos e concentração à qual estes se encontram presentes (MAURICIO *et al.*, 1997).

É de conhecimento geral que nem todas as leveduras possuem aparato enzimático necessário para conduzir a fermentação alcoólica. Existem espécies dentro do mesmo gênero que não esboçam nenhuma capacidade para este fim, entre elas estão *Pichia ambrosiae* e *P. amethionina*, outras apresentam capacidade fermentativa com relação pelo menos a um dos açúcares, como *P. dispersa* e *P. amylophila* (KURTZMAN, 1984).

Figura 4: Via metabólica da produção de etanol



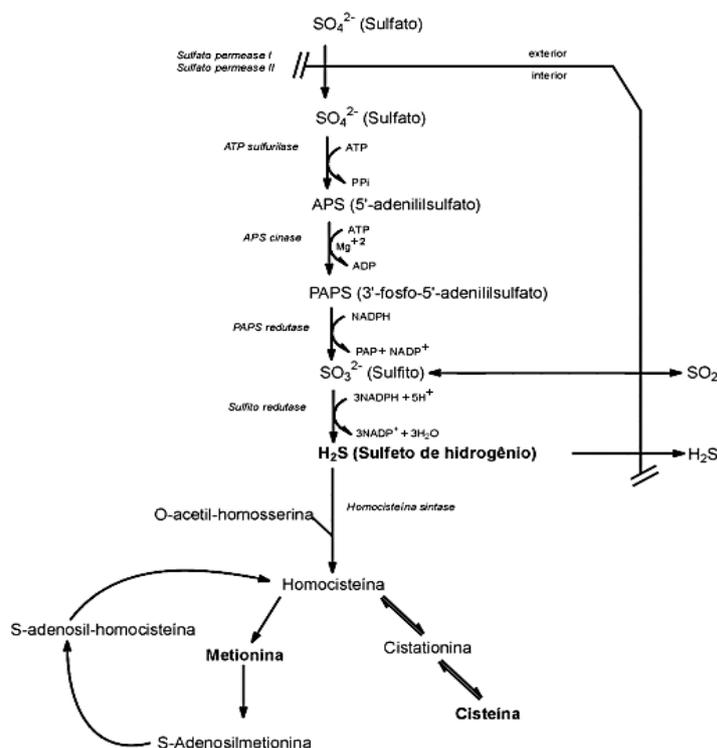
Fonte: CONN & STUMPF, 1975.

3.5 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

Os microrganismos que participam da fermentação de bebidas podem produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), e a presença deste gás pode conferir odores desagradáveis de matéria orgânica em decomposição (semelhantes a “ovos podres”) nas bebidas. Em processos fermentativos, leveduras podem acumular H_2S , dióxido de enxofre e mercaptanos. Bedriñana *et al.* (2010), avaliando 600 linhagens de leveduras autóctones isoladas de cidra, verificaram que seis linhagens de *Sacch. cerevisiae* eram produtoras de H_2S , 43 linhagens não produziram o gás e as demais linhagens apresentaram produção moderada. Em fermentações de mosto para a elaboração de vinho, mesmo inoculado com leveduras selecionadas, foi detectada a evolução de H_2S durante a fase fermentativa (EISENMAN, 2013; WLODARCZYK *et al.*, 2012b; LABORATORIES, 2011; WINTER *et al.*, 2011; UGLIANO *et al.*, 2011; SWIEGERS & PRETORIUS, 2007).

A produção de H_2S pelas leveduras (Figura 5) envolve a incorporação do sulfato na célula e a sua redução, por meio da via enzimática (NETO & FERREIRA, 2005; BERRY & WATSON, 1987).

Figura 5: Via metabólica para produção de H_2S



Fonte: NETO & FERREIRA, 2005.

Os fatores que proporcionam a formação de H₂S são variados. Dependem da linhagem (UGLIANO *et al.*, 2011; SPIROPOULOS & BISSON, 2000; ROMANO *et al.*, 1976), da composição química do meio (UGLIANO *et al.*, 2011; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010; UGLIANO *et al.*, 2009; WAINWRIGHT, 1970) e do aparato enzimático da linhagem (SPIROPOULOS & BISSON, 2000; THOMAS & SURDINKERJAN, 1997). É importante salientar que no processo de elaboração de vinho, as linhagens empregadas não formem este gás por apresentar deficiência com relação à atividade da sulfito redutase, pois a remoção do H₂S produzido nos vinhos é, segundo da Silva & da Silva (1987) um processo complexo e geralmente leva a perdas econômicas. Como já explicitado, são diversos os motivos que levam à formação de sulfeto de hidrogênio e a concentração de H₂S formada depende ainda da disponibilidade de compostos orgânicos sulfurados e das condições do processo fermentativo, cujo limiar de percepção está situado entre 0.9 - 1.5 ppb (LABORATORIES, 2011). Linderholm & Bisson (2005) estabeleceram esse limiar em torno de 11mg/L. Jiranek *et al.* (1995) salienta que leveduras podem ser induzidas a formar este gás se forem submetidas à inanição por nitrogênio prontamente assimilável. Por outro lado, leveduras também podem formar maior concentração de sulfeto de hidrogênio, quando as concentrações de nitrogênio prontamente assimilável e de sais de diamônio fosfato aumentam (UGLIANO *et al.*, 2009).

Os aminoácidos também exercem um papel importante na produção de H₂S. Wainwright (1970) mostrou que mutantes *Saccharomyces cerevisiae* que necessitavam de metionina, formavam grandes quantidades do gás a partir de sulfato, sulfito ou tiosulfato quando no meio existia concentrações subótimas de metionina. Wainwright (1971) relatou que o ácido pantotênico ou a vitamina B6 só inibiram a formação de H₂S por parte de algumas linhagens, em meio sintético. Outros aminoácidos podem estimular a produção de H₂S, entre eles estão o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a glicina, a histidina, a lisina, a ornitina e a serina.

O estudo realizado por Park *et al.* (2000), revelou que os níveis de H₂S mantiveram-se elevados nos mostos com baixa concentração de aminoácidos. Nos mostos onde era alta a concentração de aminoácidos, durante a fermentação tumultuosa, a concentração de H₂S aumentou e em seguida diminuiu até o final da fermentação. Em contraste, nos mostos com baixa concentração de aminoácidos, teve produção de H₂S em altas concentrações, durante a fermentação tumultuosa, porém a produção continuou aumentando até o fim da fermentação. Isto mostra o

envolvimento direto dos aminoácidos na inibição da produção de H₂S na produção de vinhos.

3.6 CARACTERÍSTICA *KILLER* EM LEVEDURAS

O controle biológico ocorrido por meio da eliminação de microrganismos não é considerado um fenômeno biológico novo, ele ocorre naturalmente e alguns microrganismos possuem essa habilidade. Determinadas leveduras têm a capacidade de secretar proteínas ou glicoproteínas, cuja atividade é mediada por receptores de parede celular específicos, capazes de levar à morte as leveduras sensíveis, independente de gênero e espécie. Estas proteínas são chamadas de fator *killer*, toxina *killer* ou proteína *killer*. O elemento *killer* foi detectado, pela primeira vez, em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em 1963, por Bevan e Makeover (da SILVA, 1996; BEVAN & MAKEOVER, 1963). As leveduras foram classificadas em relação a este fator da seguinte forma: *killer*, aquelas com capacidade de secretar a toxina e matar células sensíveis, representado pelo fenótipo (K+R+); sensíveis, as que são eliminadas pela linhagem *killer*, sendo representadas pelo fenótipo (K-R-) e; como neutras aquelas que são insensíveis ao fator *killer* e não produzem a toxina efetiva e mostra o fenótipo (K-R+) (da SILVA, 1996; BUSSEY *et al.*, 1982; WOODS & BEVAN, 1968). Leveduras autóctones presentes na superfície de uvas podem apresentar estas características (da SILVA *et al.*, 2011a; ZAGORC *et al.*, 2001; da SILVA, 1996).

Baseando-se nos padrões de interação de sensibilidade e atividade *killer* entre as linhagens, as leveduras foram classificadas em três grupos principais K1, K2 e K28 (SCHMITT & BREINIG, 2002). Young & Yourgiu (1978) classificaram as leveduras *killer* em dez grupos distintos de comportamento (k1 a k10). Zhu & Bussey (1989) incrementaram a classificação incluindo a classe k11, conforme descrito na tabela 2. Os tipos k1, k2 e k3 são específicos para o gênero *Saccharomyces*, enquanto que os tipos k4 a k11 são encontrados em outros gêneros (da SILVA, 1996; YOUNG & YOURGIU, 1978). O grupo K3 presente nas leveduras *Sacch. cerevisiae* não é claramente distinto do K2, acredita-se tratar de uma mutação (SCHMITT & BREINIG, 2002).

Tabela 2: Classificação das leveduras *killer*, baseada nos padrões de atividade e sensibilidade às toxinas.

Classificação <i>killer</i>	Classes sensíveis
K1	K2, K3 e K4
K2	K1 e K4
K3	K1 e K4
K4	K1
K5	K1, K3 e K4
K6	K1, K2, K3 e K4
K7	K1, K3, K4 e K6
K8	K1, K2, K3, K4 e K6
K9	K1, K2, K3, K4, K5 e K8
K10	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 e K8
K11	K1

Fonte: YOUNG & YOURGIU, 1978.

Walker *et al.* (1995), demonstraram que o fator *killer* foi capaz de eliminar diversos fungos filamentosos de interesse ambiental, as linhagens *killer* testadas de *Sacch. cerevisiae* e *Pichia* inibiram o crescimento de fungos basidiomicetos e fungos fitopatogênicos, indicando desta maneira que a toxina possui potencial de controle antimicótico. Polonelli & Morace (1986), relataram pela primeira vez, o uso da toxina *killer* contra bactérias e microrganismos sem clorofila demonstrando que o fator *killer* pode ser letal a bactérias gram-positivas.

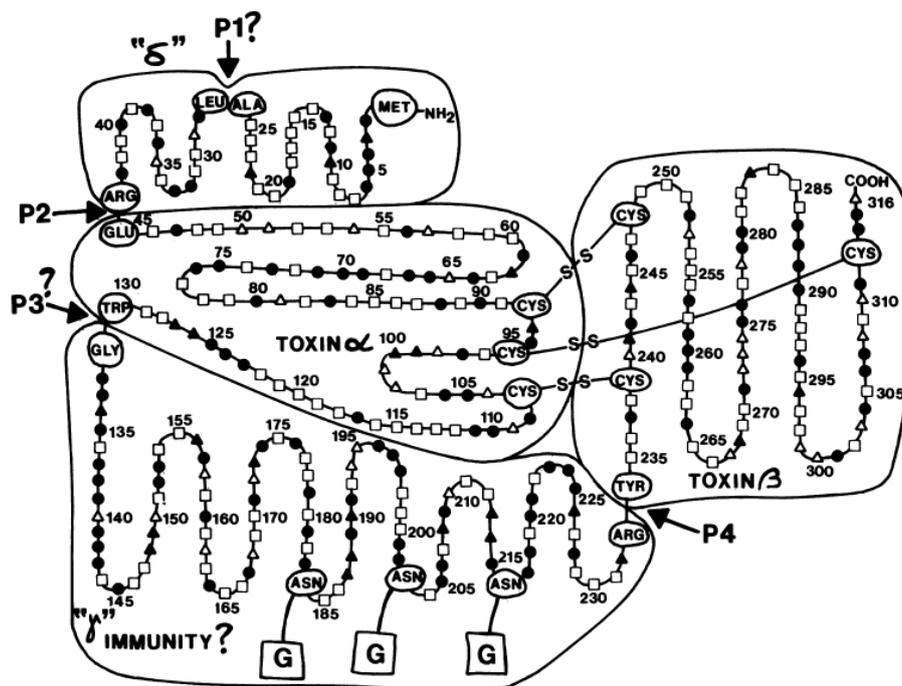
As linhagens *killer* são imunes à sua própria toxina, mas podem ser sensíveis a toxinas de outros tipos de *killer*. Existe uma diferença entre imunidade e resistência. A imunidade refere-se à resistência determinada pelo plasmídeo à toxina *killer*. A resistência refere-se a uma série mais vasta da toxina *killer* e depende de fatores externos como, por exemplo: pH, temperatura, composição do meio de cultura, fase de crescimento e de fatores internos como, alteração genoma nuclear que afeta os sítios receptores da célula (TIPPER & BOSTIAN 1984; YOUNG & YAGIU 1978; WICKNER, 1976).

O fator *killer* é uma proteína de baixo peso molecular, formada exclusivamente por genes cromossomais ou por meio da combinação destes com elementos genéticos extracromossomais. Estas representam a base citoplasmática, que é constituída de uma fita dupla de RNA encapsulada (M-dsRNA) situada no citoplasma da levedura e conhecida como VLPs (do inglês, *virus like particles*), além desta fita dupla, o citoplasma apresenta outra fita dupla de RNA (L-dsRNA) de

fundamental importância para a manutenção do plasmídeo M-dsRNA, ou seja, L-dsRNA e M-dsRNA devem estar presentes para que a linhagem expresse a ação *killer* (GOLUBEV, 2006; WICKNER, 1996; TIPPER & BOSTIAN, 1984).

A proteína *killer* formada pelo M-dsRNA, possui as subunidades δ , α , γ e β . As pontes de enxofre são responsáveis pela ligação das subunidades α e β , e somente estas são liberadas pela levedura *killer*. A subunidade β se liga à fração 1,6-D-glucana da parede celular, enfraquecendo deste modo as pontes de enxofre, liberando assim a subunidade α . A subunidade α reconhece os sítios de ligação da membrana celular da linhagem sensível aos quais se fixa, provocando alterações físicas e metabólicas profundas, que podem levar a célula sensível à morte (MAGLIANI *et al.*, 1997; SCHMITT & RADLER, 1990). O M-dsRNA é responsável por conferir a imunidade celular (da SILVA, 1996). A figura 6 mostra a sequência de aminoácidos da toxina *killer* e os sítios de clivagem para a toxina.

Figura 6: Sequência de aminoácidos da toxina *killer*

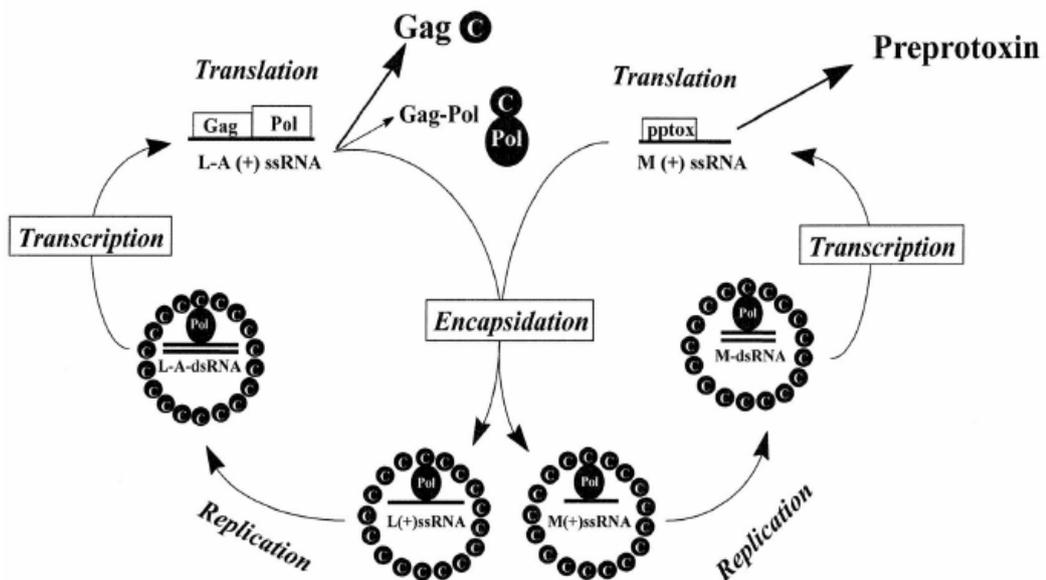


Fonte: TIPPER & BOSTIAN, 1984.

O L-dsRNA codifica a RNA polimerase (C Pol) responsável pela replicação, possui duas ORFs (do inglês, *Open Reading Frames*), ORFI e ORFII, e sintetiza sua própria capa proteica, aquela que envolve a fita dupla do M-dsRNA. A ORFI codifica

a síntese da capa proteica (Gag) e a ORFII sintetiza uma proteína RNA polimerase RNA-dependente (Pol) que se expressa como uma proteína de fusão gag-pol (ICHO & WICKNER, 1989; DINMAN *et al.*, 1991; FUJIMURA *et al.*, 1992; DINMAN & WICKNER, 1994 e SCHMITT & BREINIG, 2006). Dessa forma, existe uma interdependência na expressão de gene cromossomal e os L-dsRNA e M-dsRNA, necessária para a produção das toxinas dependentes deste sistema (SCHMITT & BREINING, 2002; da SILVA, 1996). O ciclo de replicação das formas L-dsRNA e M-dsRNA está exposto na figura 7.

Figura 7: Ciclos de replicação do L-dsRNA e M-dsRNA



Fonte: SCHMITT & BREINIG, 2002 modificado pelo autor.

O M-dsRNA possui um único quadro aberto de leitura (ORF) que codifica a pré-protóxina (SCHMITT & BREINIG, 2002, 2006; SCHMITT, 1995). A detecção em laboratório do fator *killer* em leveduras como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* depende, de fatores biológicos, como linhagens sensíveis (da SILVA, 1996; YOUNG & YAGIU, 1978), composição química do meio (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; da SILVA *et al.*, 2008), condições de cultivo (da SILVA, 1996; HEARD & FLEET, 1987); e de maneira geral, a atividade da toxina *killer* é altamente sensível a fatores como pH e temperatura de incubação das leveduras (MEINHARDT &

KLASSEN, 2009; IZGÜ *et al.*, 2005; IZGU & ALTINBAY, 2004; GUYARD *et al.*, 2002), sendo que a ocorrência de linhagens *killer*, sensíveis ou neutras está diretamente relacionada com o ambiente de onde foram isoladas (da SILVA, 1996).

No Brasil, foram avaliadas linhagens com relação às características *killer*, sensível e neutra na superfície de uvas de diferentes vinhedos da Serra Gaúcha em Bento Gonçalves -RS. O número de células com sensibilidade ou capacidade *killer* é muito variado (MALDOTTI *et al.*, 2015; CANOSSA *et al.*, 2015; de SOUZA TAVARES *et al.*, 2014; CANOSSA *et al.*, 2013; WLODARCZYK *et al.*, 2013; WLODARCZYK *et al.*, 2012c; da SILVA & DALARMI, 2003; da SILVA, 1996, 1999). No Vale do São Francisco, em Petrolina, PE, no entanto, não foram encontradas linhagens *killer* (da SILVA *et al.*, 2011a)

3.7 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS

A identificação genotípica por meio da biologia molecular representa hoje uma das áreas de maior potencial na realização de pesquisas na área médica, tendo grande relevância clínica e epidemiológica. Atualmente é uma ferramenta utilizada em pesquisa e diagnóstico na identificação de fungos de interesse da indústria alimentícia (da SILVA *et al.*, 2012; PINHO, 2006).

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é o material hereditário que cada organismo carrega, suas moléculas ordenam o funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus. A molécula de DNA tem a capacidade de permitir às suas células criarem cópias de si, ou seja, de replicar seus genes e assim transmitir a seus descendentes. Esta cópia é realizada com extrema exatidão, feita por um conjunto de proteínas e enzimas que atuam em conjunto (JOHNSON *et al.*, 2008).

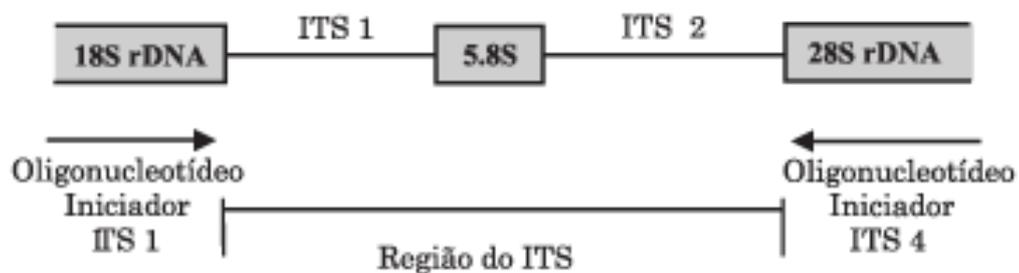
A amplificação do DNA pela técnica de reação de cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de um segmento específico do DNA dentro de um genoma, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo (SANTOS *et al.*, 2001).

A identificação taxonômica das leveduras em muitas ocasiões não é possível utilizando-se apenas a técnica de PCR, nesses casos aplica-se outra metodologia, a PCR-RFLP. A técnica de RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) está baseada na identificação de microrganismos por análise dos padrões de clivagem em fragmentos de DNA em sítios específicos. O RFLP é utilizado porque as enzimas de restrição clivam os fragmentos de DNA em diferentes perfis de

bandas, que diferem entre as espécies de microrganismos (RATÓN, 2004) e, estes são comparados a perfis já descritos.

A região mais utilizada para identificação dos fragmentos de DNA é a ITS (do inglês, *internal transcribed spacer*). A região ITS está localizada entre os genes 18S e 28S do RNA e pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões. Os ITSs contemplam duas regiões ITS1 e ITS2 tendo entre estes o 5.8S. Assim sendo, o ITS1, está localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, separa os genes 5.8S e 28S. Essa região é altamente conservada intraespecificamente, sendo frequentemente usada para a identificação de gêneros e espécies, uma vez que possibilita a distinção rápida (MENEZES *et al.*, 2009; FUNGARO, 2000). A figura 8, representa a localização da região do ITS do rDNA e o local onde os iniciadores ITS1 e ITS4 se posicionam para iniciar a extensão durante o processo de amplificação.

Figura 8: Região do rDNA com o espaço interno transcrito (ITS)



Fonte: LUPATINI *et al.*, 2008.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS, PRESERVAÇÃO E REPICAGEM

As linhagens foram obtidas de parreirais da cultivar Merlot no município de Santana do Livramento – RS, localidade (- 30.444921S. 55.251420 O), isoladas no laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho em janeiro de 2015, totalizando cinquenta indivíduos espécimes doravante chamados MSCSL15 numerados de 1 a 49 (devido a contaminação do tubo 3 esta levedura foi isolada e dividida em 3A e 3B), sendo armazenados por criopreservação. Para realização dos testes, as linhagens da série MSCSL15 (Figura 9) foram repicadas em tubos de ensaio com Meio Mosto Ágar, descrito no anexo A - 1 (da SILVA, 1996).

Figura 9: Leveduras da série MSCSL15 em Mosto Ágar

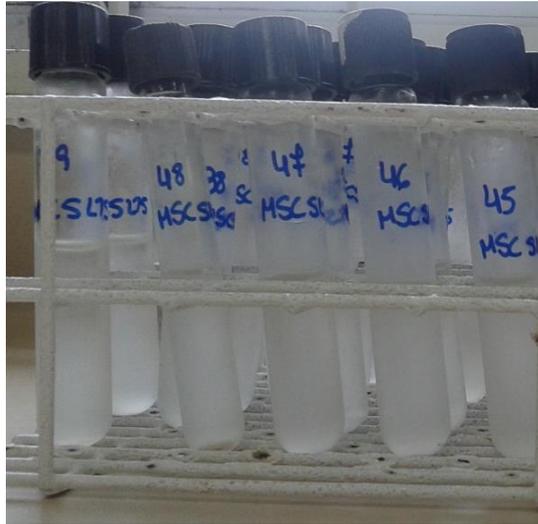


Fonte: Dados do autor.

4.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE CÉLULAS

As suspensões de células (Figura 10) foram obtidas diluindo-se uma alçada da levedura recém-crescida no meio Mosto Ágar, em tubos de ensaio contendo água destilada estéril para se obter uma concentração aproximada de 10^7 células, a concentração foi verificada por comparação a uma escala de linhas feitas em papel, conforme definição de Der Walt & Yarrow (1984).

Figura 10: Suspensões de células



Fonte: Dados do autor.

4.3 PREPARO DAS FITAS IMPREGNADAS COM ACETATO DE CHUMBO 3%

As fitas de papel filtro foram recortadas e embebidas em um volume de 100mL de solução de acetato de chumbo 3%, os papéis filtros foram acondicionados em placa de Petri (14 cm). Cada placa foi esterilizada em autoclave por 30 minutos a 121^oC. Em seguida, a placa de Petri com as fitas (Figura 11) foi colocada na estufa a 60^oC, para que as tiras de papel filtro secassem completamente (SILVA & da SILVA, 1984).

Figura 11: Fitas de acetato de chumbo



Fonte: Dados do autor.

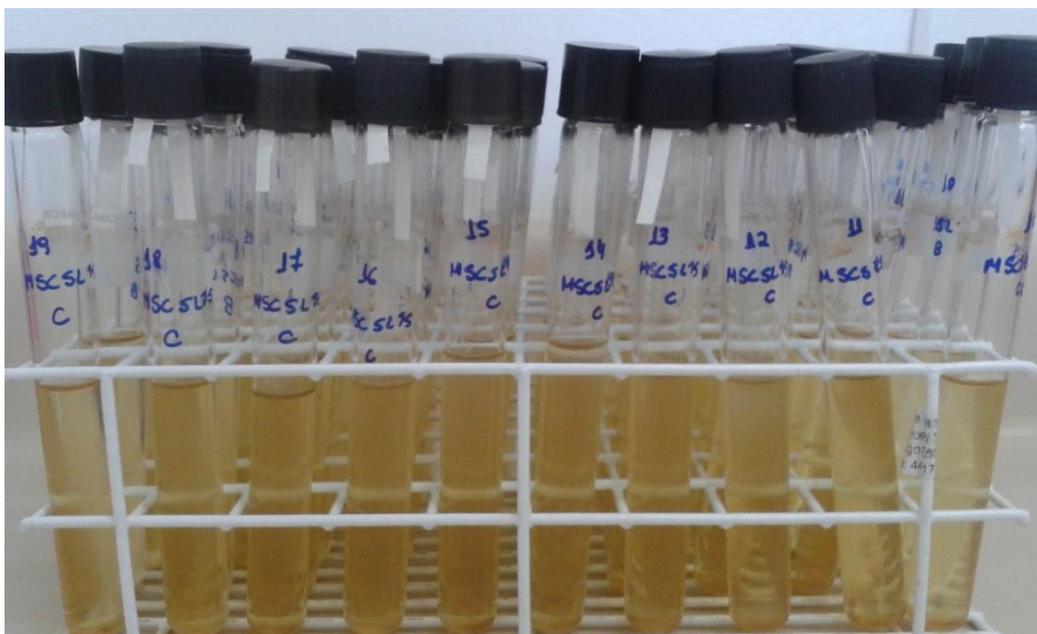
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S)

Este teste avaliou a capacidade de cada linhagem em produzir H₂S das leveduras. O teste foi efetuado em tubo de ensaio com tampa rosqueada contendo 9mL de mosto sulfito (Anexo A - 2), sendo realizado em triplicada. As fitas impregnadas com acetato de chumbo 3% foram inseridas na parte superior do tubo, de modo que metade da fita permaneceu dentro do tubo, e acima do meio Mosto Sulfito (SILVA & da SILVA, 1984). Nos tubos foram inoculados 1mL de suspensão de células das leveduras que foram avaliadas da série MSCSL15. Como padrões foram impregnadas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* K1 e *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT. Os tubos foram transferidos para estufa Lab-Line® Imperial II Incubator (USA), e incubados a 24^oC. Como o chumbo reage com o enxofre para formar sulfeto de chumbo, esta reação faz com que a cor do papel de filtro passe do branco para o marrom escuro/preto. Essa mudança de cor das fitas caracteriza a linhagem produtora de H₂S. A produção de H₂S foi continuamente monitorada por um período de 96 horas, analisando as fitas de papel de filtro e classificando as leveduras produtoras em três níveis: (0) nula; (1) baixa; (2) média; e (3) alta.

4.5 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

O objetivo do teste foi avaliar a capacidade fermentativa de cada linhagem. A avaliação foi efetuada por gravimetria (GIUDICI & ZAMBONELLI, 1992; LONGO *et al.*, 1992; da SILVA *et al.*, 2011b) nos mesmos tubos de produção de H₂S (Figura 12). Os valores obtidos remetem ao desprendimento de CO₂ em intervalos de seis e 18 horas, no período de 96 horas (SILVA & da SILVA, 1984). Os mesmos foram pesados em balança analítica TKS DJV300A, e os resultados obtidos foram comparados à velocidade das linhagens padrões 1VVT/97 e K1, as quais apresentam potencial fermentativo. O acompanhamento do desprendimento de CO₂ foi feito com auxílio de planilha, contendo os valores da pesagem, a média aritmética da triplicata, e o Δ_p (média do valor no tempo t_0 menos a média do valor no tempo t_1). A partir dos valores de Δ_p , foram obtidos os gráficos para acompanhamento da fermentação.

Figura 12: Tubos utilizados no teste de fermentação



Fonte: Dados do autor.

4.6 ATIVIDADE *KILLER*

4.6.1 Avaliação da capacidade *killer*

O teste *killer* (K^+R^+) foi realizado em duplicata em placas de Petri contendo meio Ágar Mosto 80:20 (Anexo A - 3). As placas foram inicialmente semeadas pipetando 0,1 mL de uma suspensão com concentração de 10^7 células/mL das linhagens sensíveis: 26B84, 27bMCF14, 12MCF14, 21MCF14, 40MCF14, 41MCF14, 42MCF14 e 50MCF14. As células foram espalhadas com a alça de Drigalski flambada. As leveduras da série MSCSL15 e as linhagens *killer* padrões (k1, 1B e 91B) foram transferidas como pontos duplicados para cada placa já semeada, com auxílio da alça de cromo/níquel flambada. Após, as placas foram transferidas para estufa de crescimento a 24°C por 48 horas. A característica *killer* positiva é indicada pela formação de halo de inibição ao redor das leveduras sensíveis (da SILVA, 1996). Todo o processo de manipulação das linhagens, para efetuar os testes, foi realizado em capela de fluxo laminar (vertical) TROX BR.

4.6.2 Avaliação da sensibilidade ao fator *killer*

O teste de sensibilidade ($K-R-$) foi realizado em placas de Petri contendo meio Ágar Mosto 80:20 (Anexo A - 3). Em cada placa foi semeada uma linhagem da série

MSCSL15, pipetando-se 0,1 mL de uma suspensão de células com concentração de 10^7 células/mL das linhagens da série. As linhagens foram espalhadas com alça de Drigalski flambada em bico de Bunsen. Foi investigada a sensibilidade de todas as linhagens da série MSCSL15 perante as linhagens não-*Saccharomyces cerevisiae* das séries: 17MCF14, 28MCF14, 29MCF14, 51MCF14, 2MCF14, 53MCF14, 30MPB12, 12MPB12, MBR2F14, 2MBR2F14, 9MBR2F14, 10MBR2F14, 27MBR2F14, 33MBR2F14, 34MBR2F14, 37MBR2F14 pertencentes à espécie *Candida diversa* e a linhagem 33MCF14 da espécie *Hanseniaspora opuntiae* juntamente com as leveduras *killer* padrão (k1, 1B e 91B), as quais foram transferidas em pontos duplicados, com auxílio da alça de cromo/níquel flambada. As placas foram colocadas em estufa a 24^oC por 48 horas para o crescimento. O resultado positivo para sensibilidade ao fator *killer* foi observado por meio da formação de halo de inibição de crescimento (da SILVA, 1996).

As linhagens que apresentaram resultado negativo para ambos os testes (capacidade *killer* e sensibilidade) foram classificadas como neutras (K-R+).

4.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS MSCSL15

O objetivo da realização do teste é a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal a fim de identificar as espécies das leveduras.

4.7.1 Extração do material genômico

O método utilizado para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizado por meio da técnica de congelamento e descongelamento, seguindo procedimento determinado por da SILVA *et al.* (2012a). Uma alçada de células foi transferida para um tubo de Eppendorf® contendo 300 µL de água ultra-pura estéril, homogeneizado em vortex e, em seguida, levada a suspensão ao freezer (-20°C). Depois de congelada, a amostra foi descongelada e agitada durante 60 segundos em vortex, para possibilitar o rompimento das células, seguido do extravasamento do material genômico. Congelado novamente e repetido o descongelamento para garantir o rompimento das células, conforme da Silva *et al.* (2012).

4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi amplificada por PCR a região ITS do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 com os *primers* (iniciadores) ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G'3) e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE *et al.*, 1990). Os reagentes e suas respectivas quantidades estão descritos no anexo B.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Proflex™ - PCR System, nas seguintes condições: iniciado um ciclo de desnaturação a 95°C por cinco minutos; 40 ciclos com as condições: 95°C por trinta segundos para a etapa de desnaturação, 60°C por um minuto para o pareamento, 72°C um minuto para a extensão da cadeia e por último um ciclo de 72°C por dez minutos para a extensão final. Foram adicionados 2,1 µL do corante azul de bromofenol a 4,5 µL do produto de PCR, aplicados em gel de agarose (1,5%). Adicionou-se o marcador (Norgen LowRanger 100 pb DNA Ladder), na alíquota de 4,5 µL e o produto da PCR foi submetido à eletroforese horizontal na corrente elétrica de 120/110V, por aproximadamente 2 horas (figura 13). O gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL por 20 minutos, visualizado em luz UV e fotografado no transluminador BIO RAD Gel Doc™.

Figura 13: Cuba de eletroforese e fonte utilizados na PCR e RFLP



Fonte: Dados do autor.

4.7.3 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

O resultado da amplificação por ITS1-5.8S-ITS2 foi submetido à ação das enzimas de restrição *Hinf*I (*Haemophilus influenza*, 5' G↓ANTC 3' – 5' CTNA↑G 3'); *Hae*III (*Haemophilus aegyptius*, 5'GG↓CC3' – 3'CC↑GG5') e *Mbo*II (*Moxarella bovis*, 5' GAAGA(N₈)↓3' – 3'CTTCT(N₇)↑5' T). As condições utilizadas para clivagem do amplicon estão indicadas na tabela 3:

Tabela 3: Condições das enzimas de restrição

Reagente	Volume *		
	<i>Hinf</i> I*	<i>Hae</i> III**	<i>Mbo</i> II***
Enzima			
Água	3,5 µL	3,5 µL	3,65 µL
Tampão (+MgCl ₂)	1,0 µL	1,0 µL	1,00 µL
Enzima	0,5 µL	0,5 µL	0,25 µL
Soro BSA	-	-	0,1 µL
Total	5 µL	5 µL	5 µL
Condições de tempo	20 minutos	2 horas	12 horas

Nota: *Jgben Bioscience; **Sigma; ***Promega

Para o volume final da reação de clivagem foi adicionado ao mix das enzimas 5 µL do produto de PCR. A solução foi incubada em estufa a 37°C, o tempo necessário para clivar o amplicon da região ITS1-5.8S-ITS2 variou conforme a enzima, conforme descrito na tabela 3. Depois de decorrido o tempo, adicionou-se 4,5 µL do marcador (DNA-LADDER – Low Ranger 100 pb – Norgen – Canadá). Os produtos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 3% a 90 V durante duas horas. O gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, durante 20 minutos, visualizado em luz UV e fotografado em fotodocumentador.

A identificação de gêneros e espécies das leveduras da série MSCSL15 foi realizada através dos resultados obtidos (PCR e RFLP) e sua comparação com os dados presentes no estudo de Agustini *et al.* (2014).

5.7.4 Abreviação de gêneros

Deve ser salientado que as abreviações, referentes aos gêneros *Saccharomyces* e *Hanseniaspora*, adotadas neste trabalho foram às mesmas empregadas por van Rij (1984) e nas coleções de microrganismos:

- ATCC: The American Type Culture Collection
- CBS: Centraalbureau Schimmelcultures-Utrecht
- LKB: Laboratoy of the Kondama Brewing Company
- NRRL: The Northern Recional Research Laboratory

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

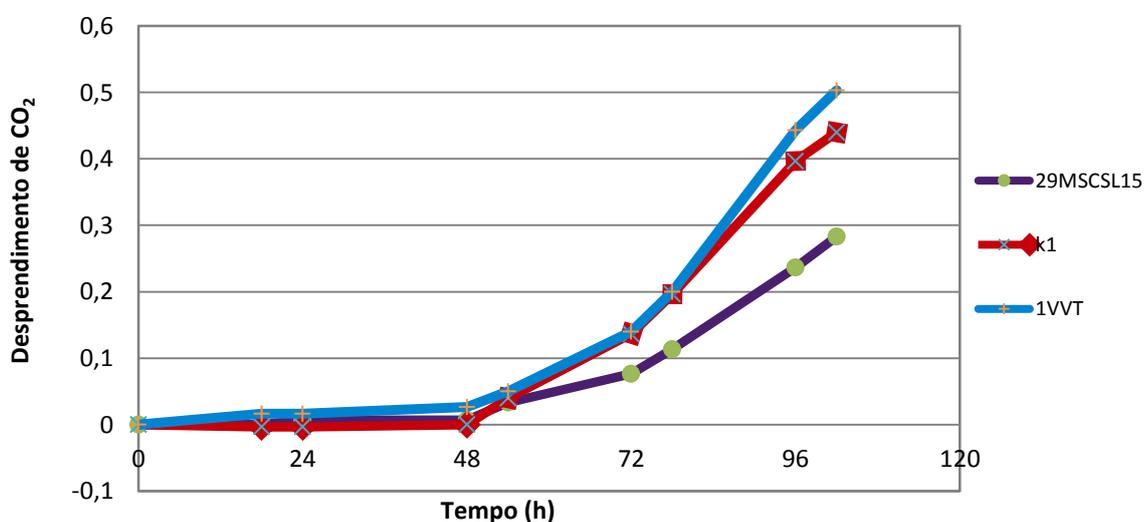
5.1 VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

As linhagens isoladas das uvas Merlot de Santana do Livramento, utilizadas neste trabalho, não apresentaram adequada formação de CO_2 , indicando baixa atividade metabólica com relação à formação de etanol. Das 50 linhagens, apenas uma linhagem (2%) - 29MSCSL15 – exibiu, embora que limitada, atividade metabólica fermentativa e não apresentou capacidade fermentativa antes de 48 horas.

A velocidade de fermentação das 50 linhagens MSCSL15 deste trabalho foram comparadas com a capacidade fermentativa das linhagens padrões *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT97 e K1 (linhagem comercial Lallemand - Canadá), que iniciaram a fermentação após 24 horas.

As leveduras consomem o açúcar presente no mosto, convertendo-o em etanol e CO_2 . Estequiometricamente, para cada molécula de CO_2 liberada equivale à mesma quantidade molar de etanol. Logo, quanto maior a quantidade de CO_2 desprendida, maior a quantidade de etanol formada. A velocidade de fermentação da linhagem 29MSCSL15 e dos padrões em função do tempo são mostrados na figura 14.

Figura 14: Velocidade de fermentação da linhagem 29MSCSL15 e dos padrões 1 VVT e K1



A linhagem 29 da série MSCSL15 corresponde à levedura da espécie *Hanseniaspora uvarum*, a qual apresenta baixo metabolismo fermentativo, e a presença deste gênero tem sido usada em fermentações mistas com *Sacch. cerevisiae* devido à produção de compostos voláteis, os aromas obtidos são considerados um diferencial em comparação aos vinhos elaborados com uma cultura pura de *Sacch. cerevisiae* contribuindo a uma qualidade superior do produto final (TRISTEZZA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2011).

Conforme já comentado anteriormente, 98% das leveduras da série MSCSL15 apresentaram baixa capacidade fermentativa, sendo, muito provável que as leveduras da série pertençam a gêneros e espécies que possuem baixa velocidade de fermentação. Ainda que não tenham sido indentificadas todas as linhagens da série, podemos sugerir que dentre as 50 leveduras isoladas, nenhuma pertencia ao gênero *Saccharomyces*, uma vez que está levedura apresenta bom potencial fermentativo. Segundo Van der Westhuizen *et al.* (2000) a ausência do gênero *Sacch. cerevisiae* em videiras poderia estar associado ao elevado número de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae* que normalmente são encontradas em uvas, e ao uso repetitivo de fungicidas uma vez que, estes poderiam estar afetando a microflora presente nas uvas.

As espécies autóctones, por estarem presentes em maior quantidade nas uvas, são as responsáveis por conduzir o processo inicial de fermentação alcoólica e contribuem para a complexidade e a diversidade aromática, parâmetros que assumem cada vez maior relevância por parte dos consumidores. Com o aumento da concentração de etanol no meio, a atividade metabólica destas leveduras é inibida, por não suportarem altas concentrações de álcool. A partir da metade do processo até o final, a *Sacch. cerevisiae* é responsável pela condução da fermentação alcoólica (FLEET, 2008; ROMANO *et al.*, 2003).

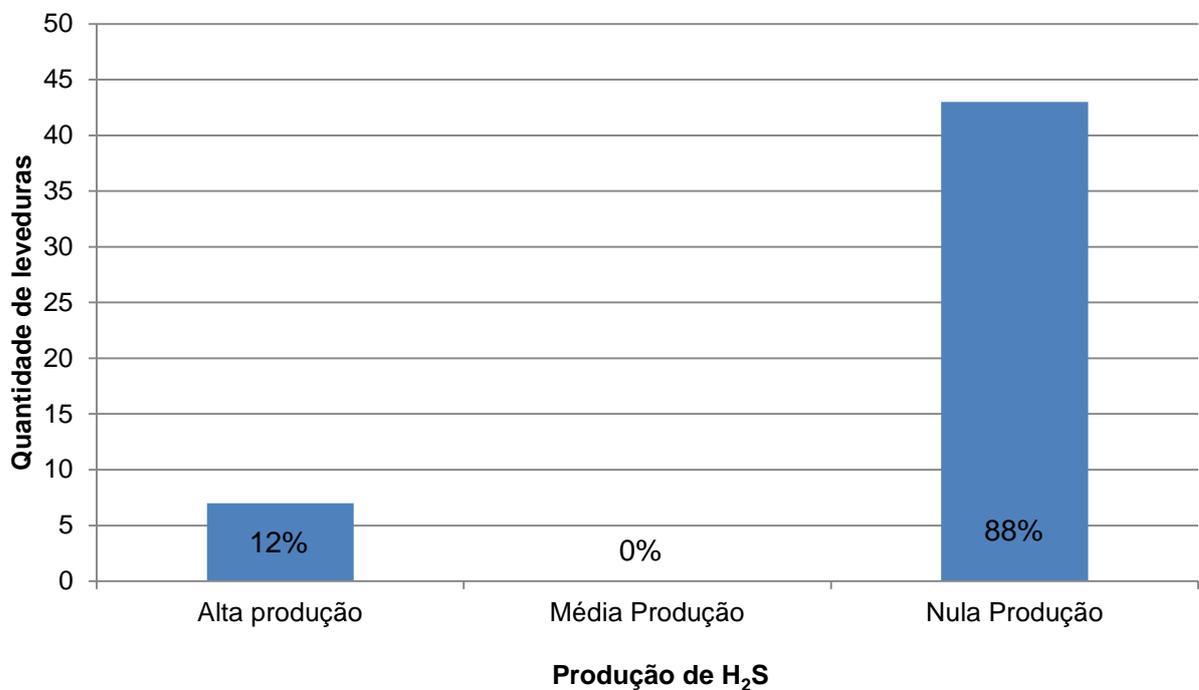
A adequada capacidade fermentativa é indispensável para a elaboração de vinhos com qualidade, este estudo demonstrou que as linhagens da série testadas neste trabalho não possuíram este potencial.

Nota: O gênero e espécie comentado neste item de resultado será devidamente apresentado e explicado no item 5.5.

5.2 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

Das 50 linhagens testadas neste trabalho, seis apresentaram alta produção de H₂S, o que corresponde a 12%. Verificou-se que a maioria das linhagens 88%, não apresentou produção de H₂S (Figura 15). Este trabalho confirma que o meio empregado induz a formação deste gás e também revela que a produção depende da linhagem de levedura (EISENMAN, 2013). Mamun-or-rashid *et al.* (2013) afirmam não ter encontrado leveduras produtoras de H₂S entre as linhagens estudadas em Savar - Bangladesh, este fato pode estar relacionado com o baixo número de linhagens investigadas - seis - ou com as condições de cultivo empregadas no estudo, uma vez que foi usado um aparelho com uma placa de silício para mensurar a produção do gás. da Silva *et al.* (2012 b) avaliaram, em triplicata, 120 linhagens, as mesmas apresentaram alta capacidade fermentativa e não formaram H₂S, representando 13,3%, apenas uma destas formou H₂S em pequena quantidade. As linhagens isoladas que apresentaram produção apreciável deste composto corresponderam a 35,8%, porém todas com baixa capacidade fermentativa.

Figura 15: Leveduras produtoras de H₂S



Os gêneros de leveduras que apresentaram alta produção de H₂S, neste trabalho, estão descritos na tabela 4:

Tabela 4: Produção de H₂S da Série MSCSL15

Linhagem da série	Levedura
5MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>
13MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>
14MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>
34MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>
35MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>
37MSCSL15	<i>Issatchenkia terricola</i>

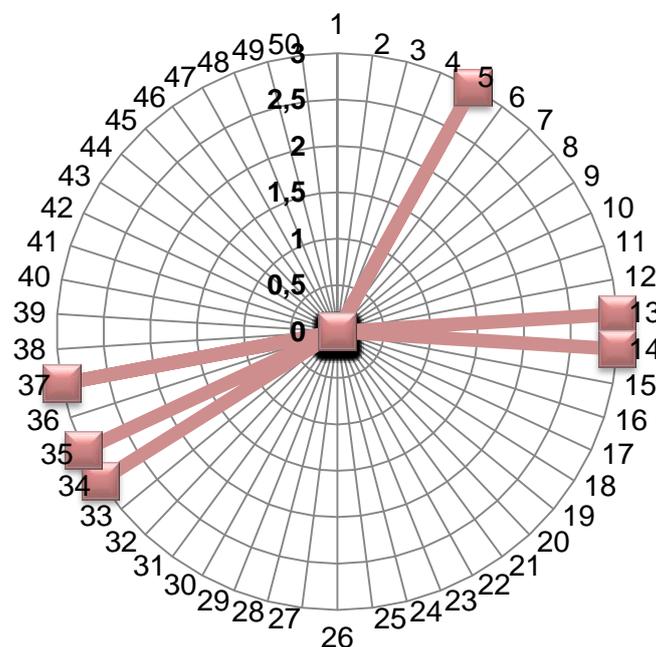
Nota: Os gêneros e espécies comentados neste item de resultados serão devidamente apresentados e explicados no item 5.5.

O gênero da levedura, a composição do meio de cultura e o metabolismo de aminoácidos que contém enxofre podem influenciar diretamente na quantidade de H₂S produzida. Canossa *et al.* (2014), observaram que em 100 linhagens de leveduras isoladas das cultivares Malvasia Branca e Moscato Alexandria da região de Farroupilha – RS, 61% das linhagens isoladas foram capaz de produzir H₂S no meio Mosto Sulfito. Bonet *et al.* (2015), analisando o comportamento de 50 leveduras isoladas na cultivar Goethe da região de Urussanga – SC, verificaram que 70% produziram H₂S no meio Mosto Sulfito.

A diversidade de leveduras encontradas nas cultivares é afetada por diversos fatores como: a localização do parreiral, o uso de fungicidas, a idade do vinhedo, as condições climáticas, entre outros. No estudo realizado por Bisson & Kunkee (1991), os autores evidenciaram que a levedura *Issatchenkia* foi detectada apenas nas variedades das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot. Assim sendo, a diversidade quanto à produção de H₂S presente nas áreas geográficas estudadas não podem ser atribuídas a uma única variável (LI *et al.*, 2010).

Na figura 16 está apresentado o gráfico que demonstra a produção de H₂S de acordo com a região deste estudo. Quanto ao nível de produção as leveduras foram numeradas de 0 a 3, e indicam: o (0) como nula produção; (1) como baixa produção; (2) como média produção e (3) como alta produção.

Figura 16: Nível de produção de H₂S das linhagens isoladas da cultivar Merlot



Nota: Os números de 1 a 50 indicam as leveduras da série MSCSL15.

O percentual de leveduras que produzem H₂S pode variar significativamente. No presente estudo a maioria das linhagens não produziram H₂S, mas esta minoria estando presente durante o processo de vinificação pode comprometer a qualidade do produto final. Salientamos que neste estudo e nos estudos anteriormente citados de Canossa *et al.* (2014) e Bonet *et al.* (2015) os testes foram efetuados em meio Mosto Sulfito, porém, a concentração de sulfeto de hidrogênio nestes trabalhos foram superiores aos encontrados na série MSCSL15, esta diferença de variação pode estar associada à variedade da cultivar na qual as leveduras foram isoladas e aos gêneros aos quais estas pertencem.

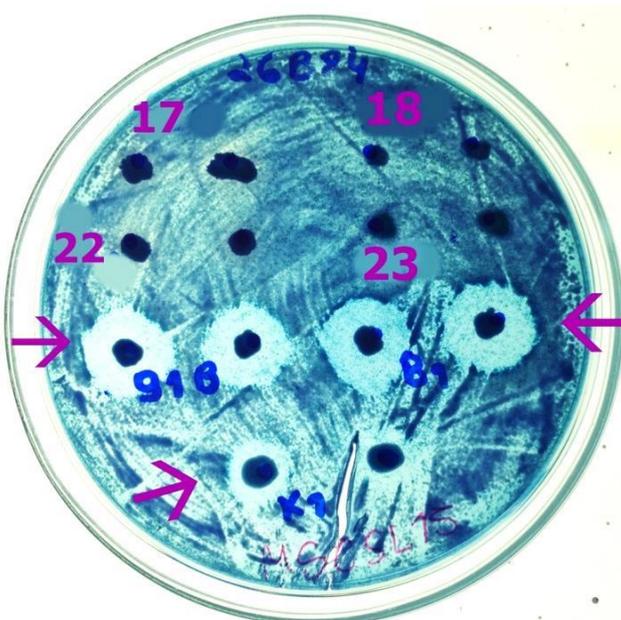
5.3 LINHAGENS *KILLER*

Foi observado que dentre as 50 linhagens autóctones da cultivar Merlot do município de Santana do Livramento – RS, nenhuma das linhagens teve comportamento *killer* (K⁺R⁺), ou seja, nenhuma linhagem teve capacidade de eliminar as leveduras testadas.

Na figura 17, é possível visualizar as linhagens da série MSCSL15 (17, 18, 22, e 23) em pontos duplicados e sem o halo de inibição. Os padrões *killer* (k1, 91B

e 1B) apresentam-se em pontos duplicados com os halos de inibição, caracterizando-se como positivos para o fator *killer*.

Figura 17: Linhagens MSCSL15 e padrões *killer* do laboratório, no meio Mosto 80:20



Nota: Os números 17, 18, 22 e 23 indicam as leveduras da série MSCSL15, negativas para o teste *killer*. As flechas indicam os padrões de leveduras *killer* (916, B1 e K1), possibilitando visualizar os halos de inibição.

Neste trabalho o meio de cultura utilizado foi o Mosto Lorena 80:20, sabe-se que o meio de cultura para detecção do fator *killer* pode influenciar o resultado do teste. O meio YEPD tamponado (pH 4,5) tem sido o mais empregado para detectar tal fator, porém, nem sempre os resultados com este meio são consistentes, ou seja, o fator *killer* pode estar presente, mas pode não ser detectado. Włodarczyk *et al.* (2012), compararam os meios de cultura para avaliar a atividade *killer* e demonstraram que 55% das linhagens testadas apresentaram comportamento *killer* no meio Mosto Lorena 80:20, e as mesmas linhagens apresentaram 30% de positividade em meio YEPD.

A distribuição de leveduras *killer* na natureza é variável conforme o gênero e espécie da levedura, bem como a localização geográfica em que foram isoladas. Na França, por exemplo, o fator *killer* variou de 0 a 100%; na cidade de Tourraine, nenhuma linhagem *killer* foi encontrada, enquanto que nas cidades Beaujolais e Gard, o fator *killer* esteve presente em 80% a 100% das leveduras testadas (CUINER & GROS, 1983). No Brasil, no Vale do São Francisco, em Petrolina - PE,

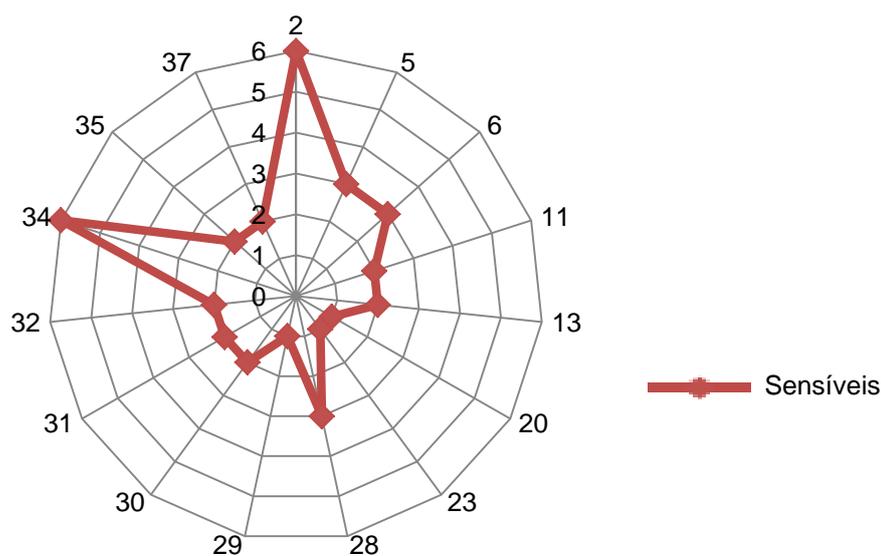
não foram encontradas linhagens *killer*, a partir de cultivares *Vitis vinifera* (da SILVA *et al.*, 2011a), em estudo realizado na Serra Gaúcha, em leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot oriundas de Pinto Bandeira verificou-se que somente 6% apresentaram comportamento *killer* (CANOSSA *et al.*, 2012).

Atualmente não existe um consenso pelos autores sobre a utilização de leveduras *killers* no processo de vinificação, da Silva (1996) e Canossa *et al.* (2012), preconizaram a utilização de leveduras neutras, uma vez que possuem capacidade de resistir a ação das linhagens *killer* e não impedem o desenvolvimento das linhagens presentes no início da fermentação, que são responsáveis pela formação de aromas diferenciados.

5.4 LINHAGENS SENSÍVEIS E NEUTRAS

As linhagens que apresentaram comportamentos sensíveis (K-R-) da série MSCSL15, perante as linhagens testadas foram: 2MSCSL15, 5MSCSL15, 6MSCSL15, 11MSCSL15, 13MSCSL15, 20MSCSL15, 23MSCSL15, 28MSCSL15, 29MSCSL15, 30MSCSL15, 31MSCSL15, 32MSCSL15, 34MSCSL15, 35MSCSL15, 37MSCSL15, correspondendo a 30% das linhagens da série, conforme indicado na figura 18.

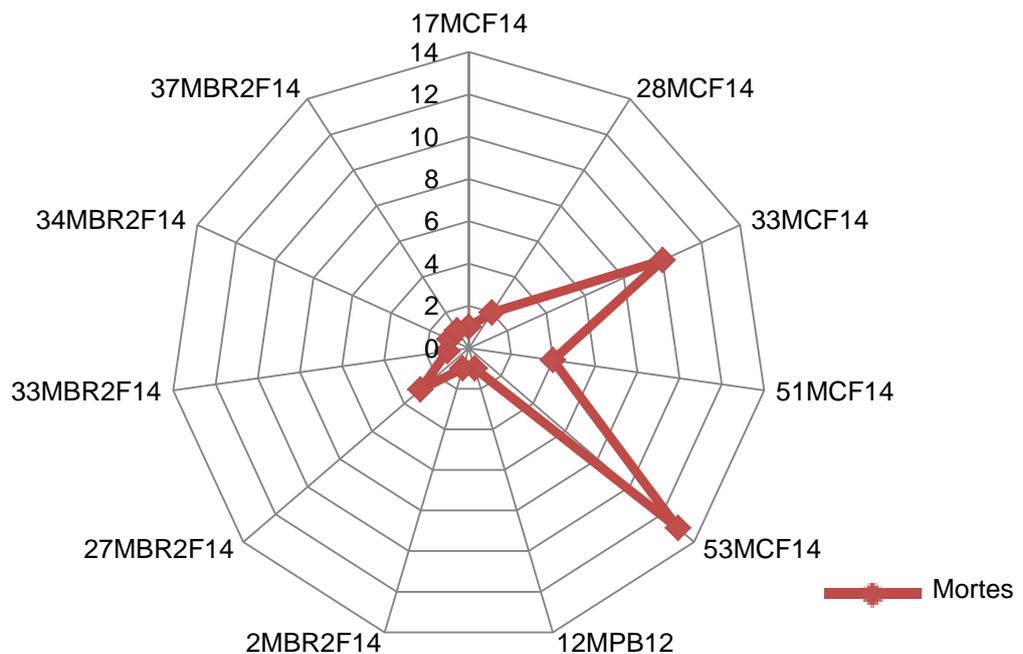
Figura 18: Linhagens sensíveis da série MSCSL15



Nota: Os números 2 a 37 correspondem às linhagens da série MSCSL15 positivas para o comportamento de sensibilidade e os números de 0 a 6 indicam perante quantas linhagens as leveduras foram sensíveis.

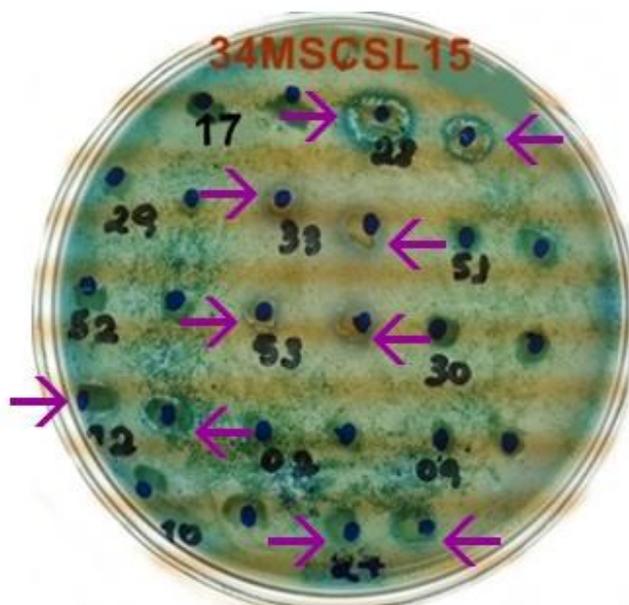
As linhagens que apresentaram o comportamento sensível mais expressivo foram 2MSCL15 e 34MSCSL15 (representada na figura 20). Nenhuma das linhagens da série MSCSL15 foram sensíveis as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (91B84, 1B84 e K1), sendo as linhagens não-*Saccharomyces cerevisiae* as que ocasionaram mais mortes, 33MCF14 (10 mortes) corresponde a espécie *Hanseniaspora opuntiae* e 53MCF14 (13 mortes) corresponde a espécie *Candida diversa* conforme a figura 19. A presença do comportamento de sensibilidade nas leveduras é variado na natureza. CANOSSA *et al.* (2012), avaliando leveduras das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot verificaram que nenhuma linhagem apresentou comportamento positivo para sensibilidade.

Figura 19: Leveduras utilizadas no teste de sensibilidade



Nota: Os números de 0 a 14 indicam quantas leveduras da série MSCSL15 foram mortas pelas leveduras sensíveis da série MCF14, MBR2F14, MPB12.

Figura 20: Linhagens MSCSL15 sensíveis às linhagens testadas

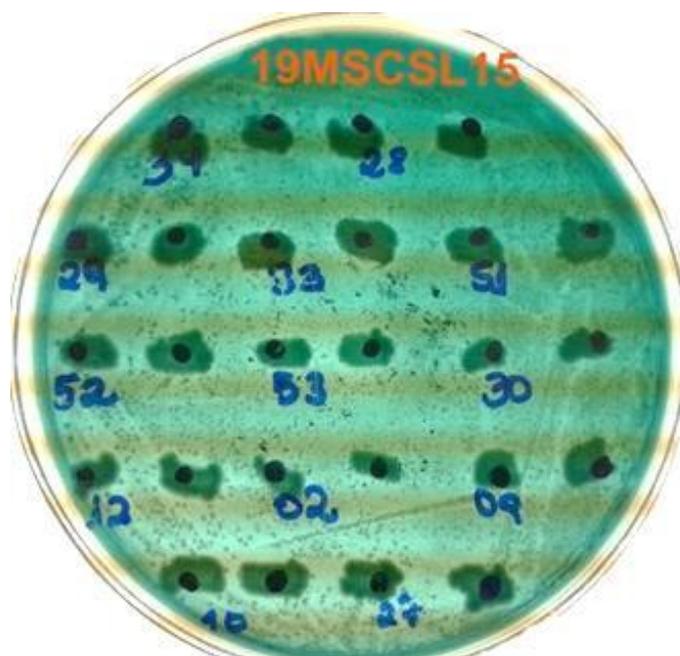


Nota: Na imagem é possível visualizar a linhagem 34MSCSL15 com halo de inibição nos pontos duplicados 28, 33, 51, 53, 12 e 27 estes pontos apresentam-se como positivos para o teste de sensibilidade.

No presente estudo as linhagens da série MSCSL15 foram testadas para o comportamento de sensibilidade perante 16 linhagens de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae* das séries MCF14, MBR2F14 e MPB12. Os resultados encontrados poderiam ser diferentes, caso as linhagens da série fossem testadas perante outras linhagens.

As linhagens 1MSCL15, 3AMSCSL15, 3BMSCL15, 4MSCL15, 7MSCL15, 8MSCL15, 9MSCL15, 10MSCL15, 12MSCL15, 14MSCL15, 15MSCL15, 16MSCL15, 17MSCL15, 18MSCL15, 19MSCL15, 21MSCL15, 22MSCL15, 24MSCL15, 25MSCL15, 26MSCL15, 27MSCL15, 33MSCSL15, 36MSCL15, 38MSCL15, 39MSCL15, 40MSCL15, 41MSCL15, 42MSCL15, 43MSCL15, 44MSCL15, 45MSCL15, 46MSCL15, 47MSCL15, 48MSCL15 e 49 MSCL15 não foram sensíveis a nenhuma linhagem testada. Na figura 21 é possível visualizar uma das placas da linhagem 19MSCL15 no teste de sensibilidade.

Figura 21: Linhagens MSCSL15 não-sensíveis às linhagens testadas



Nota: Na imagem 21, é possível visualizar a linhagem 19MSCSL15, perante as linhagens testadas em pontos duplicados, sem nenhum halo de inibição, o que significa que o teste de sensibilidade é negativo.

As demais linhagens testadas da série MSCSL15 apresentaram comportamento neutro (K-R+), representando 70% das linhagens, ou seja, não mataram e não foram eliminadas pela toxina *killer*.

5.5 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS

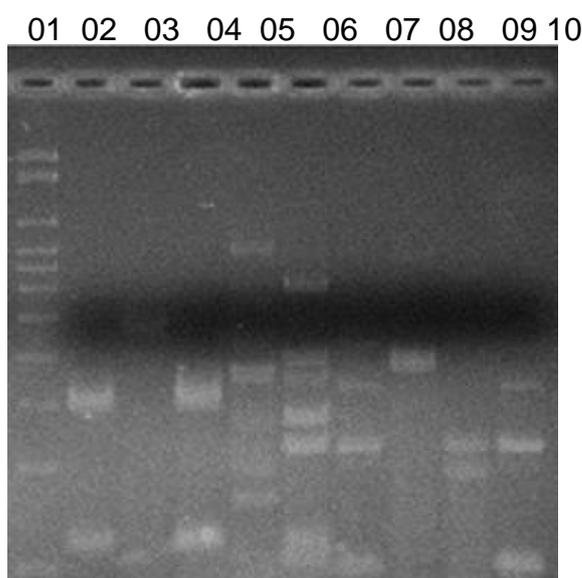
Os critérios utilizados para a escolha da identificação das leveduras da série MSCSL15 foram baseados nos comportamentos que as mesmas expressaram durante os testes (fermentação, produção de H₂S, fator *killer*, sensibilidade ou neutralidade ao fator). Deste modo, as mesmas foram agrupadas em onze comportamentos distintos e foram identificadas uma linhagem de cada comportamento por PCR-ITS e RFLP.

Quando não é possível identificar gêneros e espécies através do PCR por apresentarem *amplicons* muito semelhantes, como é o caso das espécies *Hanseniaspora* (*H'spora uvarum* e *H'spora opuntiae*) as quais apresentam *amplicons* de 770 pares de bases, conforme descrito em estudo de Agustini *et al.* (2014), o produto de PCR é submetido à ação das enzimas de restrição por RFLP como forma

de confirmar a diferença das espécies (ORTIZ *et al.*, 2013; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; GUILLAMÓN *et al.*, 1998).

A figura 22 apresenta os diferentes perfis de fragmentação das linhagens da série MSCSL15. A espécie *Issatchenkia terricola* teve seu perfil descrito por ITS-RFLP em estudo de Agustini *et al.* (2014) apresentando *amplicon* de 420 pb e fragmentos de restrição para *HaeIII* (290, 120 pb) e *HinfI* (220, 100, 100 pb). Granchi *et al.* (1999) apresentaram para a mesma levedura o perfil de ITS-RFLP com *amplicon* de 416 pb e perfil de restrição para *HaeIII* (290, 120 pb) e *HinfI* (225, 100, 84 pb). No presente estudo as linhagens 5MSCSL15, 13MSCSL15, 14MSCSL15, 34MSCSL15, 35MSCSL15 e 37MSCSL15 foram identificadas como *Issatchenkia terricola*. As linhagens 5MSCSL15 e 13MSCSL15 apresentaram *amplicon* em ITS de aproximadamente 450 pb e perfil de fragmentação para *HaeIII* 120 e 300 pb e *HinfI* 105 e 220 pb. A linhagem 14MSCSL15 apresentou *amplicon* de aproximadamente 420 pb e perfil de fragmentação para *HaeIII* de 300 e 120 pb e *HinfI* de 220 e 100 pb. As linhagens 34MSCSL15 e 35MSCSL15 apresentaram *amplicon* em ITS de aproximadamente 450 pb, perfil de fragmentação para *HaeIII* de 120, 300 pb e *HinfI* de 230, 100 pb. A linhagem 37MSCSL15 apresentou *amplicon* em ITS de aproximadamente 450 pb com perfil de fragmentação para *HaeIII* 120, 300 pb e para *HinfI* de 220, 100 pb.

Figura 22: Gel com perfis de fragmentação das linhagens da série MSCSL15

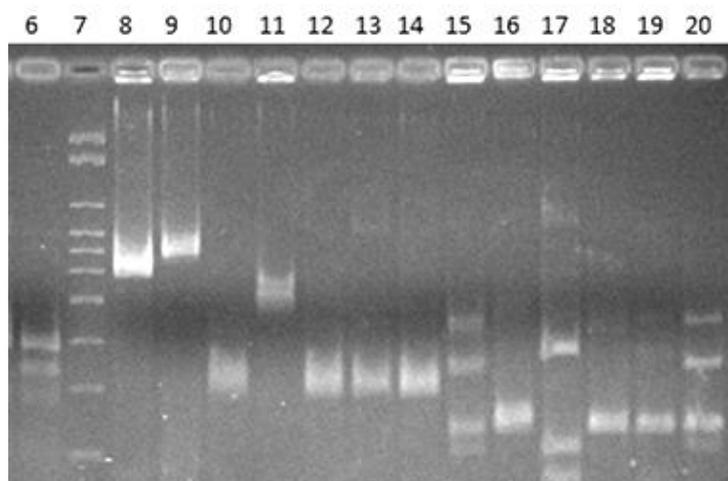


Legenda: no ponto 01 é possível visualizar o marcador, no ponto 02 (5MSCSL15), 03 (11MSCSL15) e no 04 (13MSCSL15) a ação da enzima *HaeIII*, e nos 5 a 10 as linhagens 1MSCSL15, 2MSCSL15,

5MSCSL15, 6MSCSL15, 11MSCSL15 e 13MSCSL15 com ação da enzima *HinfI*. Nota: Marcador de massa molecular 100 pb Norgen.

A figura 23 apresenta os perfis de fragmentação das enzimas *MbolI*, *HaeIII* e *HinfI*. A espécie *Hanseniaspora uvarum* teve seu perfil descrito por ITS-RFLP em estudo de Agustini *et al.* (2014) apresentando seu *amplicon* em ITS de 770 pb e perfil de restrição para *HinfI* (340, 190, 160 pb). Guillamón *et al.* (1998) apresentaram o perfil de *Hanseniaspora uvarum* por meio de ITS-RFLP e obtiveram um *amplicon* em ITS de 760 pb e clivagem para *HinfI* (360, 200, 180 pb). No presente estudo as linhagens 1MSCSL15 e 29MSCSL15 foram identificadas como *Hanseniaspora uvarum* apresentando *amplicon* em ITS de aproximadamente 770 pb. A linhagem 1MSCSL15 teve seu perfil de fragmentação para *HinfI* 340, 200 e 180 pb e *MbolI* de 390, 340 e 110 pb, já a linhagem 29MSCSL15 apresentou perfil de fragmentação para *HinfI* 390, 200 e 180 pb e *MbolI* de 390, 350 e 120 pb.

Figura 23: Gel com perfis de fragmentação das linhagens da série MSCSL15



Legenda: No ponto 06 é possível visualizar a linhagem 1MSCSL15 com ação da enzima *MbolI*, no ponto 7 o marcador, do ponto 8 ao 14 a ação da enzima *HaeIII* para as linhagens da série em sequência 2MSCSL15, 6MSCSL15, 14MSCSL15, 20MSCSL15, 34MSCSL15, 35MSCSL15 e 37MSCSL15 e do ponto 15 ao 20 a ação da enzima *HinfI* para as linhagens em sequência 20MSCSL15, 29MSCSL15, 34 MSCSL15, 35MSCSL15 e 37MSCSL15. Nota: Marcador de massa molecular 100 pb Norgen.

No estudo de Agustini *et al.* (2014) a levedura *Starmerella bacillaris* apresentou *amplicon* de 475 pb e perfil de clivagem em *HinfI* (240, 230 pb). No presente estudo a linhagem 20MSCSL15 foi identificada por *Starmerella bacillaris* e seu *amplicon* foi clivado em fragmentos de 240 e 230 pb pela enzima *HinfI*. Esta

linhagem foi confrontada com a linhagem 44VVT/99 *Starmerella bacillaris* para confirmação do resultado uma vez que, as leveduras *Starmerella bacillaris* e *Candida stellata* são quase indistinguíveis em testes taxonômicos.

A presença de *Starmerella bacillaris* está associada a vinhos botritizados. Estes vinhos são elaborados a partir de uvas infectadas com o fungo *Botrytis cinerea*, este fungo pode provocar na uva uma podridão nobre, gerando um aumento na concentração de açúcar, produção de glicerol e síntese de álcoois (BORGES, 2016; COLA, 2012) e estão entre os mais raros e deliciosos do mundo, conseguindo se manter dessa forma por mais de 100 anos (ACADEMIA DO VINHO, 2016). O fungo *Botrytis cinerea* se desenvolve sobre as uvas podendo ser observado no microscópio. Em estado avançado de desenvolvimento é possível percebê-lo nas extremidades dos cachos (PELICIOLI, 2008). Convém salientar que para ação do *Botrytis cinerea* ser positiva, as uvas devem ser íntegras, ou seja, sem ferimentos.

As linhagens 2MSCSL15 e 6MSCSL15 não foram identificadas até o presente o momento, pois não responderam aos iniciadores da região ITS, uma alternativa a sua identificação seria o sequenciamento genético da região D1/D2. A linhagem 11MSCSL15 apresentou seu *amplicon* em ITS de aproximadamente 450 pb, teve seu perfil de fragmentação para *HinfI* 190 e 220 pb, provavelmente seja uma *Candida azyma*, mas teria que sequenciar a levedura para confirmação de resultado. As demais linhagens da série MSCSL15 não foram identificadas neste estudo, mas serão oportunamente identificadas por Maldi-Tof-MS, seguindo procedimentos definidos por Agustini *et al.* (2014), em futuros projetos desenvolvidos pelo laboratório de Microbiologia do Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho.

Pequenas variações foram encontradas na identificação das espécies deste trabalho, entretanto, estas variações em geral foram mínimas e não comprometem o procedimento de identificação.

A superfície dos cachos de uvas é caracterizada pela presença de um elevado número de microrganismos, entre eles, leveduras, fungos filamentosos, bactérias e vírus. Leveduras dos mais variados gêneros e espécies estão presentes, as quais são essenciais durante o processo fermentativo e influenciam consideravelmente a qualidade sensorial do vinho (RASPOR *et al.*, 2006).

As espécies de leveduras nativas - não-*Saccharomyces cerevisiae* - iniciam a fermentação alcoólica no mosto de uva, porém nas etapas mais tardias da fermentação, a *Sacch. cerevisiae* torna-se prevalente. Ainda que as leveduras

nativas não-*Saccharomyces cerevisiae* permaneçam pouco tempo no mosto, a atividade destas é suficiente para causar impacto no produto final, o vinho (FLEET, 2008; 2003).

A presença das leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Starmerella bacillaris* associadas com a *Sacch. cerevisiae* durante o processo fermentativo demonstraram um aumento dos compostos voláteis no vinho (ANDORRÀ *et al.*, 2012). O aroma de um vinho é formado através de compostos voláteis e estes, contribuem para uma qualidade superior do vinho. Nos vinhos tintos, os teores voláteis apresentam um teor médio mais elevado em comparação aos vinhos brancos (RIZZON, 1987).

O gênero de levedura *Issatchenkia* é um dos mais encontrados em cachos de uvas (FLEET, 2008). A *Issatchenkia terricola* não tem sido usada em fermentações mistas devido à elevada produção de acetato de etila (JIMENEZ-CLEMENTE *et al.*, 2005). O acetato de etila em altas concentrações nos mostos proporciona um gosto acético aos vinhos, diminuindo a qualidade final do produto (RIZZON, 1987). O estudo realizado por TRISTEZZA *et al.* (2013) demonstrou que uma linhagem de *Issatchenkia terricola* foi capaz de produzir histamina e cadaverina, duas aminas biogênicas, que em grandes quantidades em bebidas estão associadas a quadros toxicológicos graves (GOMES *et al.*, 2012).

A diversidade de microrganismos presentes em cachos de uvas é associada às características climáticas específicas e regionais, demonstrando assim a importância que a variedade microbiana exerce sobre a qualidade final do produto, apresentando-se como única (BOKULICH *et al.*, 2013). Convém salientar que a diversidade microbiana das uvas podem também depender do tipo de defensivos agrícolas, frequência de aplicação desses e suas dosagens de uso.

6. CONCLUSÃO

As leveduras presentes nas bagas de uvas apresentam comportamentos metabólicos distintos e nem sempre mostram aptidão enológica adequada. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de continuar-se seleccionando leveduras autóctones com características adequadas para elaboração de vinhos.

7. REFERÊNCIAS

ACADEMIA DO VINHO. Espécies. Disponível em: <http://www.academiadovinho.com.br/_ela_videira.php>. Acesso em: 04 novembro de 2015.

ACADEMIA DO VINHO. Glossário enológico. Disponível em: <<http://www.academiadovinho.com.br/biblioteca/glossari.htm>>. Acesso em 27 de junho de 2016.

AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C.; BONFIM, T. M. B. e da SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology** 98 (12): 5645-5654, 2014.

ALBERTO, J.; RAFF, L. e WALTER R. **Molecular biology of the cell**. 5^o edição, páginas 197-198, 2008.

ANDORRÀ, I.; BERRADRE, M.; MAS, A.; ESTEVE-ZARZOSO, B. e GUILLAMÓN, J. M. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. **LWT - Food Science and Technology** 49 (1): 8-13, 2012.

APROVALE, Indicação Geográfica. Disponível em: <<http://www.valedosvinhedos.com.br/vale/conteudo.php?view=70&idpai=132#null>>. Acesso em 29 de novembro de 2015.

BEDRIÑANA, R. P.; SIMÓN, A. Q. e VALLES, B. S. Genetic and henotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from asturias. **Food Microbiology** 27(4): 503-508, 2010.

BERRY, D. R. & WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds. In: D. R. Berry, I. Russell, G. G. S., editor. **Yeast Biotechnology (First Edition)**. Allen & Unwin, London. Capítulo 11: 345–367, 1987.

BERTHELS, N. J.; CORDERO, O. R. R.; BAUER F. F, THEVELEIN, J. M. and PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 4 (7): 683-689, 2004.

BELY, M.; SABLAYROLLES, M., J. and BARRE, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. **Journal of fermentation and bioengineering** 70 (4): 246–252, 1990.

BEVAN, E. A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the *Killer* character in yeast. **Proceeding of the Fifth International Conference on Genetics** 1: 202-203, 1963.

BOKULICH, N. A. THORNGATE J. H.; RICHARDSON, P. M. and MILLS, D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and

climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 111 (1): 139-148, 2013.

BONET, J.; AGUSTINI, B. C.; MORINI, M. A, L. e da Silva, G. A. Caracterização de leveduras isoladas de bagas de uva Goethe da região de Urussanga (SC) para a elaboração de vinhos. **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves-RS, 3 a 7 de Novembro de 2015.

BOONMAK, C.; JINDAMORAKOT, S.; KAWASAKI, H.; YONGMANITCHAI, W.; SUWANARIT, P.; NAKASE, T. and LIMTONG, S. *Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the Saturnispora clade isolated in Thailand. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 9 (4): 668–672, 2009.

BOONMAK, C.; LIMTONG S.; JINDAMORAKOT, S.; AM-IN, S.; YONGMANITCHAI, W.; ICHIRO, S. K.; NAKASE, T. and KAWASAKI, H. *Candida xylanilytica* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 61(5): 1230–1234, 2011.

BORGES, J. L. Leveduras as operárias da produção de vinhos. Winestyle nº: 70. Disponível em: <<http://www.artwine.com.br/edicoes/wine-style-10-leveduras-as-operarias-da-producao-de-vinhos.pdf>>. Acesso em 29 de outubro de 2015.

BORGES, J. L. *Botrytis cinerea* um fungo com múltiplas facetas. Disponível em: <<http://www.artwine.com.br/edicoes/wine-style-6-botrytis-cinerea-um-fungo-de-multiplas-facetas.pdf>>. Acesso 25 de junho de 2016.

BORMAN, A. M.; LINTON C. J.; MILES S. J. and JOHNSON E. M. Molecular identification of pathogenic fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 61 (1): i7–12, 2008.

BOSTIAN, K. A.; STURGEON, J. A. and TIPPER, D. J. Encapsidation of yeast *killer* doublestranded ribonucleic acids: dependence of m on l. **Journal of Bacteriology** 143 (1): 463–470, 1980.

BUSSEY, H.; SACKS, W.; GALLEY, D. and SAVILLE, D. Yeast *Killer* Plasmid Mutations Affecting Toxin Secretion and Activity and Toxin Immunity Function. **Molecular and Cellular Biology** 2 (4): 346–354, 1982.

BUSSEY, H. & SKIPPER N. Membranemediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. **Journal of Bacteriology** 124 (1): 476-483, 1975

CANOSSA, S.; AGUSTINI, B. C.; MANFROI, V. e da SILVA, G. A. Caracterização das leveduras isoladas de uvas das cultivares Malvasia Bianca e Moscato Alexandria da região de Farroupilha-RS. **XII Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho - VIII Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, 24 a 25 de Julho, 2014.

CANOSSA, S.; AGUSTINI, B. C.; MANFROI, V. e da SILVA, G. A. Características das linhagens isoladas de bagas de uva da cultivar Moscato tradicional da região de Farroupilha-RS. **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia e XIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. BRASIL - Rio Grande do Sul - Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 2015.

CANOSSA, S.; LIMA, R. B.; AGUSTINI, B. C. e da SILVA, G. A. Características de leveduras isoladas de uvas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot da região de Pinto Bandeira- RS. **Estágio - Trabalho de Conclusão de Curso**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS - Campus Bento Gonçalves-RS. Curso de Viticultura e Enologia, 2013.

CANOSSA, S., WLODARCZYK, S. R. & da SILVA, G. A. Características de leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot de Pinto Bandeira-Bento Gonçalves. **X Encontro de Iniciação Científica e VI Encontro de Pós-Graduandos**. Embrapa, Bento Gonçalves, RS. Página 48, 2012.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. e RITSCHKE, P. Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 1º edição, página: 64 , 2010.

CAMARGO, U. A. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/cultivar.htm>>. Acesso em 30 de outubro de 2015.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ F. J. L. and RODRÍGUEZ-VICO F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology** 21 (2): 149-155, 2004.

COLA, L. O que é o *Botrytis Cinerea*, o fungo mágico da podridão nobre?. Disponível em: <<http://blogs.gazetaonline.com.br/vinhosemaisvinhos/2012/06/o-que-e-o-botrytis-cinerea-o-fungo.html> >. Acesso em 27 de junho de 2016.

COMITINI, F.; INGENIIS J. D.; J. I., PEPE L.; MANNAZZU I. e CIANI M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* Killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters** 238 (1): 235-240, 2004.

CONN, E. C. & STUMPF, P. K. Introdução à bioquímica. Tradução Lília Menuveca. 3ª edição. Edgard Blücher: São Paulo, 1975.

CNPUV, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM UVA E VINHO (CNPUV). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/pesquisa-e-desenvolvimento>>. Acesso em: 01 de outubro de 2015.

da SILVA, J. P. L; VIANA, L. A. N.; de SOUZA, E. F.; LIMA, I. S.; FRAGA, M. E. e OLIVEIRA, E. M. M. Caracterização molecular de fungos filamentosos da coleção de

micro-organismos de interesse da indústria de alimentos. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Coleções de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos. **II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**. Belém-Pará, 24 a 28 de setembro de 2012.

da SILVA, G. A. Evidência de uma linhagem de levedura com característica *killer*, neutra e sensível. **Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. Página: 169, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 1999.

da SILVA, G. A. Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade *killer*. **Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. Página 170, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 1999.

da SILVA, G. A.; BERNARDI T. L.; SCHAKER, P. D. C.; MENEGOTTO M. and VALENTE P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freezethawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 55 (2): 319-327, 2012a.

da SILVA, G. A. The occurrence of *Killer*, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behavior. **Applied microbiology and biotechnology** 46: 112-121, 1996.

da SILVA, G. A. & DALARMI, L. Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. **Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. Página: 214, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 2003.

da SILVA, G. A. & de Almeida, E. A. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives Biology and Technology** 49 (3): 411–419, 2006.

da SILVA, G. M.; SILVEIRA, F. R. X. D. and PIRES, M. D. F. C. Adherence to hela cells, typing by *Killer* toxins and susceptibility to antifungal agents of candida dubliniensis strains. **Brazilian Oral Research** 21 (1): 87-91, 2007.

da SILVA, S.; CALADO, S.; LUCAS, C. and AGUIAR, C. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* *Killer* toxin, cnkt. **Microbiological Research**. 163 (2): 243-251, 2008.

da SILVA, G. A. Elaboração de vinho: Aspectos microbiológicos. **Frutas do Brasil: Uva para processamento Pós-Colheita**. Embrapa/Mapa. Embrapa Informação Tecnológica - Brasília – DF. Página: 67, 2003.

da SILVA, G. A., MENEGOTTO, M., SCHAKER, P. D. C., BERNARDI, T. L., de MELLO, L. M. R., and PEREIRA, G. E. São Francisco Valley Region and the autochthonous yeast of the Brazilian Northeast. **In 34th World Congress of Vine and Wine**. 9th General Assembly of the OIV., Lisboa (Portugal), 2011a.

da SILVA, G. A., POLETTI, C. M., POLI, J. S. and VALENTE, P. (2011b). Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 54 (2): 347–356, 2011b.

da SILVA, G. A., WLODARCZYK, S. R. e de SOUZA, R. C. (2012b). Avaliação de leveduras isoladas na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (rs) com relação à produção de H₂S e velocidade de fermentação. **II Simpósio de bioquímica e biotecnologia (SIMBBTEC)**. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

da SILVA, M. A. A. A. e da SILVA, G. A. Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho. Technical report, Embrapa, CNPUV. p. 5-9, Circular Técnica Bento Gonçalves, 1987.

da SILVA, S., CALADO, S., Lucas, C. and AGUIAR, C. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaeensis* killer toxin, cnkt. **Microbiological Research** 163 (2): 243-251, 2008.

de SOUZA Tavares, B.; BERND, L. P.; AGUSTINI, B. C. e da SILVA, G. A. Caracterização e identificação de leveduras autóctones isoladas de uvas da cultivar Moscato Branco, na região de Farroupilha - RS. Estágio - **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. Embrapa Uva e Vinho - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Bento Gonçalves, 2014.

DER WALT, V. & YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. The yeasts a taxonomic study, capítulo II. Elsevier, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, 3ª edição. Páginas: 45-194, 1984.

DINMAN, J. D.; ICHO, T. & WICKNER, R. B. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded rna virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 88 (1): 174–178, 1991.

DINMAN, J. D. & WICKNER, R. B. Translational maintenance of frame: mutants of *saccharomyces cerevisiae* with altered -1 ribosomal frameshifting efficiencies. **Genetics** 136 (1): 75, 1994.

EISENMAN, L. Hydrogen sulfide in fermentations. Technical report. Disponível em: <<http://gencowinemakers.com/docs/Hydrogen>>. p. 1-2, 2013.

ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F. and QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International journal of systematic bacteriology** 49 (1): 329-337, 1999.

EMBRAPA, Indicações Geográficas de Vinhos Finos do Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/ig/>>. Acesso em 29 de novembro de 2015.

EMBRAPA, Farroupilha é a nova Indicação de Procedência de Vinhos Finos do Brasil. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/>>

/noticia/3690520/farroupilha-e-a-nova-indicacao-de-procedencia-de-vinhos-finos-do-brasil>. Acesso em 25 de novembro de 2015.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology** 86 (1): 11-22, 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. Food Science, School of Chemical Sciences and Engineering. University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 8 (7): 979–995, 2008.

FUJIMURA, T., RIBAS, J. C., MAKHOV, A. M. and WICKNER, R. B. Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral rna of yeast I-a virus. **Nature** 359 (6397): 746-749, 1992.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia, Diagnóstico e Análise de Variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 17: 12-16, 2000.

GAYEVSKIY, V. & GODDARD, M. R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with wines in new Zealand. **The ISME Journal** 6 (7): 1281-1290, 2012.

GIOVANNINI, E. Manual de Viticultura. 1ª edição. Página 2, 2014.

GIUDICI, P. & KUNKEE, R. E. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture** 45 (1): 107–112, 1994.

GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. Russia Collection of Microorganisms, Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino. Capítulo: 10, páginas: 142-290, 2006.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P. e MARIN V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva** 19 (4): 1123-1134, 2014.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A. and VINCENZINI, M.. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by pcr-rflp analysis of the rdna its region. **Journal of Applied Microbiology** 87 (6): 949–956, 1999.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J. and QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology** 169 (5): 387– 392, 1998.

GUYARD, C.; SÉGUY, N.; CAILLIEZ, J.-C.; DROBECQ, H.; POLONELLI, L.; DEICAS, E.; MERCENIER, A.; and MENOZZI, F. D. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted *killer* toxin with broadspectrum antimicrobial activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 49 (6): 961-971, 2002.

HALOUI, N. E., PICQUE, D. and CORRIEU, G. Alcoholic fermentation in winemaking: on-line measurement of density and carbon dioxide evolution. **Journal of Food Engineering** (8): 17–30, 1988.

HEARD, G. M. & FLEET, G. H. Occurrence and growth of *killer* yeasts during wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology** 53 (9): 2171–2174, 1987.

HERNÁNDEZ, A., MARTÍN, A., CÓRDOBA, M. G., BENITO, M. J., ARANDA, E. and PÉREZ-NEVADO, F. Determination of *killer* activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **International Journal of Food Microbiology** 21(2): 178–188, 2008.

HOECKEL, P. H. de O.; de FREITAS, C. A. e de OLIVEIRA, G. N. A concentração de mercado no setor vinícola do rio grande do sul (2004-2012), 2013.

IBGE, Dados de previsão de safra produção – brasil outubro 2015. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=3&u3=1&u4=16>>. Acesso em 28 de outubro de 2015.

IBRAVIN, Comercialização e importação. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos.php>>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

IBRAVIN. História do vinho no Brasil. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Historia-do-Vinho-no-Brasil>>. Acesso em: 28 novembro de 2015.

ICHO, T. & WICKNER, R. B. The doublestranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. **The Journal of Biological Chemistry** 264 (12): 6716–6723, 1989.

IZGU, F. & ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the k5-type yeast *killer* protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 68 (3): 685–693, 2004.

IZGU, F.; ALTINBAY, D. e SERTKAYA, A. Enzymic activity of the k5-type yeast *killer* toxin and its characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 69 (11): 2200-2206, 2005.

JARVIS, B. W.; WICKES, B. L. and HOFFMAN, L. M. Direct genomic dna sequencing for rapid fungal identification. **EPICENTRE Biotechnologies Forum** 13 (4): 8, 2012.

JIMENEZ-CLEMENTE, J. M.; MINGORANCECAZORLA, L.; MARTINEZRODRIGUEZ, S.; HERASVAZQUEZ, F. J. and RODRIGUEZVICO, F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. **Food Microbiology** 98 (3): 301-308, 2005.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P. and HENSCHKE, P. A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology** 61(2): 461–467, 1995.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P. and HENSCHKE, P. A. Validation of bismuth – containing indicator media for predicting H₂S- producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture** 46 (2): 269-273, 1995.

JOHNSON, H. A HISTÓRIA DO VINHO. The Story of Wine, Londres, julho de 1989. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/Vinho/A_HISTORIA_DO_VINHO.pdf>. Acesso em: 28 novembro de 2015.

KURTZMAN, C. *Pichia Hansen. kreger-van-rij the yeasts a taxonomic study*. In The yeasts a taxonomic study, Elsevier, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands. 3^o edição, capítulo 21, páginas: 295–377, 1984.

KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the "Saccharomyces complex" determined from multigene sequence analyses. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 3 (4): 417–432, 2003.

LABORATORIES, E. ETS volatile sulfide analysis. Technical report. Disponível em: <<http://www.etslabs.com/display.aspx?catid=48,50,66&pageid=94>> .p. 1-4, 2011.

LI, S. S.; CHENG, C.; LI, Z. CHEN, J.; YAN, B.; HAN, B. and REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology** 138: 85-90, 2010.

LINDERHOLM, A. L. & BISSON, L. F. Elimination formation of hydrogen sulfide by *Saccharomyces*. **Practical Winery and Vineyard Magazine**, 2005.

LONGO, E.; CANSADO, J.; SIERO, C.; CALO, P.; VELAZQUEZ, J. B. e VILLA, T. G. Influence of the curing *killer* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 8: 147-150, 1992.

LUPATINI, M; MELLO, A. H. e ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden. **Revista Brasileira Ciências Solo** 32: 2677-2682, 2008.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D. and POLONELLI, L. Yeast *killer* system. **Clinical Microbiology Reviews** 10 (3): 369–400, 1997.

MAURICIO, J. C.; MORENO, J.; ZEA, L.; ORTEGA, J. M. e MEDINA, M. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 75: 155-160, 1997.

MAKOWER, M. & BEVAN, E. A. The inheritance of a *Killer* characte in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In Geerts, S., editor, Genetics today. Xith International Congress of Genetics., volume 1, página 202. Pergamon Press, Oxford, 1963.

MALDOTTI, V.; AGUSTINI, B. C.; MORINI, M. A. L.; e da SILVA, G. A. Avaliação de sensibilidade de leveduras neutras a linhagens *killer* não-*Saccharomyces*. **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia e XIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, 2015.

MAMUN-OR-RASHID, A. N. M.; DASH, B. K.; CHOWDHURY, M. N. A.; WAHEED, M. F. e PRAMANIK, M. K. Exploration of potential baker's yeast from sugarcane juice: optimization and evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 16 (13): 617-623, 2013.

MEHLOMAKULU, N. N., SETATI, M. E. e DIVOL, B. Characterization of novel *killer* toxins secreted by wine-related non-*saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. **International Journal Food Microbiology** 188: 83-91, 2014.

MELLO, Loiva M. F., Área e Produção de Uvas: Panorama Mundial. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/producaomundial.pdf>>. Acesso em: 30 de Outubro de 2015.

MELLO, Loiva M. F., Área cultivada no Rio Grande do Sul: 2008 - 2012. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc087.pdf>>. Acesso em 28 de Outubro de 2015.

MELLO, Loiva M. F., Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em 04 de Novembro de 2015.

MELLO, Loiva M. F., Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot121.pdf>>. Acesso em 06 de Novembro de 2015.

MENDES-FERREIRA, A., BARBOSA, C., INÊS, A. e MENDES-FAIA, A. The timing of diammonium phosphate supplementation of wine must affects subsequent H₂S release during fermentation. **Journal of Applied Microbiology** 108 (2): 540-549, 2010.

MENEZES, J. P.; MANZONI, C. G.; LUPATINI, M.; JUNGES E. e ANTONIOLLI, Z. I. VARIABILIDADE GENÉTICA NA REGIÃO ITS DO rDNA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. (BIOCONTROLADOR) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciências e agrotecnologia** 34 (1): 132-139, 2010.

MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T. and VASCONCELOS, I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food Control** 22 (5): 662-667, 2011.

NETO, L. & MENDES-FERREIRA, A. A. PESQUISA DE ATIVIDADE SULFITO REDUTASE EM LEVEDURAS DE ORIGEM ENOLÓGICA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25 (2): 275-278, 2005.

ORTIZ, M. J.; BARRAJÓN, N.; BAFFI, M. A.; ARÉVALO-VILLENA, M. and BRIONES, A. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. **LWT - Food Science and Technology** 50 (2): 371–377, 2013.

PARK, S.; BOULTON R. and NOBLE A. Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. **American Journal of Enology and Viticulture** 51 (2): 91-97, 2000.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E., DRUVEFORS, U. A. and SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 6 (1): 3-13, 2006.

PASSOTH, V.; OLSTORPE, M. and SCHNÜRER, J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. **Antonie Van Leeuwenhoek** 99 (1): 121–125, 2011.

PELICIOLI, D; de SOUZA, G. R. A vinificação do vinho licoroso de sauternes. **Trabalho de conclusão de curso**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS - Campus Bento Gonçalves-RS. Curso de Tecnólogo em Viticultura e Enologia, 2008.

PINHO, M. S. L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Revista brasileira de Coloproctologia** 26 (3): 331-336, 2006.

POLONELLI, L. & MORACE, G. Reevaluation of the yeast *killer* phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology** 24 (5): 866-869, 1986.

RASPOR, P.; MILEK D. M.; POLANC, J.; MOZINA, S. S. and CADEZ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology** 109 (1–2): 97-102, 2006.

RATÓN, T. O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología** 21: 15-19, 2004.

RIZZON, L. Composição química dos vinhos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do sul (MRH 311) – Compostos voláteis. Comunicado técnico número 5, páginas: 1-4, 1987.

RIZZON, L. & MIELE A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 23: 156-161, 2003.

ROMANO, P.; FIORE, C., PARAGGIO, M.; CARUSO M. and CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology** 86 (1-2): 169-180, 2003.

ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. and SOLI, M. G. Biosynthesis of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* i analysis of suplhite-producing strains. **Archives of Microbiology** 108 (2): 211-215, 1976.

SANTOS L. R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P. e LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS** 29 (2): 87-92, 2001.

SCHNEIDER, J.; RUPP, O., TROST, E., JAENICKE, S., PASSOTH, V., GOESMANN, A., TAUCH, A. and BRINKROLF, K. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research** 12 (3): 382-386, 2012.

SCHMITT, M. J. & RADLER, F. Blockage of cell wall receptors for yeast *killer* toxin KT28 with antimannoprotein antibodies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 34 (8): 1615-1618, 1990.

SCHMITT, M. J. & BREINIG, F. The viral *killer* in yeast: from molecular biology to application. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews** 26 (3): 257-276, 2002.

SCHMITT, M. J. Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 *killer* toxin gene in yeast. **Molecular Genetics and Genomics** 246 (2): 236-246, 1995.

SCHMITT, M. J. & BREINIG, F. (2006). Yeast viral *killer* toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology** 4 (3): 212-221, 2006.

SPIROPOULOS, A. & BISSON, L. F. MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology** 66 (10): 4421-4426, 2000.

SILVA, G. A. & da SILVA, M. A. A. A. Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras. Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa. Relatório técnico. Embrapa-DDT, Brasília, 1984.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. and PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research** 11 (2): 139-173, 2005.

SWIEGERS, J. H. & PRETORIUS, I. S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74(5): 954–960, 2007.

TECCHIO, Marco Antonio. Cultura da videira: origem, importância econômica e botânica. Disponível em <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv5724/1%20aula%20esalq%20origem%20historia%20d%20ados%20economicos%20botanica%20atual.pdf>>. Acesso em: 04 de novembro de 2015.

TIPPER, D. J. & BOSTIAN, K. A. Double-Stranded Ribonucleic Acid *killer* Systems in Yeasts. **Microbiological reviews** 48 (2): 125-156, 1984.

TIPPER, D. J. & SCHMITT, M. J. Yeast dsrna viruses: replication and *killer* phenotypes. **Molecular Microbiology** 5 (10): 2331–2338, 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, Berdell R. and CASE, Christine L. **Microbiologia**. Artmed. 10ª edição, página: 332, 2012.

TONIETTO, J. Disponível em < <http://www.bonvivant.com.br/2014/10/22/indicacoes-geograficas-brasileiras/>>. Acesso em 30 de novembro de 2015.

TONIETTO, J. O conceito de denominação de origem uma opção para o desenvolvimento do setor vitivinícola brasileiro. Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho Bento Gonçalves, RS. Página: 8, 1993.

TONIETTO, J. Embrapa desenvolve indicação geográfica com produtores de vinho do Sul. Disponível em: < <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/indicacao.html>>. Acesso em 29 de novembro de 2015.

THOMAS, D. & SURDIN-KERJAN, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 61(4): 503-532, 1997.

TRISTEZZA, M.; VETRANO, C.; BLEVE G.; SPANO G., CAPOZZI V.; LOGRIECO A.; MITA G. and GRIECO F. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. **Food Microbiology** 36 (2): 335-342, 2013.

TRISTEZZA, M.; TUFARIELLO, M.; CAPOZZI, V.; SPANO, G.; MITA G. and GRIECO F. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* simultaneous and sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. **Frontiers in Microbiology** 7 (670): 1-14, 2016.

UGLIANO, M., FEDRIZZI, B., SIEBERT, T., TRAVIS, B., MAGNO, F., VERSINI, G. e HENSCHKE, P. A. Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in shiraz fermentation and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57 (11): 4948–4955, 2009.

UGLIANO, M. & HENSCHKE., P. A. Comparison of three methods for accurate quantification of hydrogen sulfide during fermentation. **Analytica Chimica Acta** 660 (1-2): 87:91, 2010.

UGLIANO, M., KOLOUCHOVA, R. and HENSCHKE, P. A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 38 (3): 423–429, 2011.

VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O. P. H and PRETORIUS, I. S. Geographical Distribution of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture** 21 (1): 3-9, 2000.

VAN RIJ, N. J. W. K., editor. The yeasts a taxonomic study. **Elsevier**: Amsterdam, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, 1984.

VIEL, A. Exploitation of microbial capability to enhance the characteristics of typical regional wines Prosecco and Tocai. In 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD. **Research on Food Science Technology and Biotechnology** University of Sassari, Oristano. September 16 – 18, 2009.

WAINWRIGHT, T. Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitam b6 deficiency. **Journal of Genreal Microbiology** 61: 107-119, 1970.

WAINWRIGHT, T. Production of H₂S by yeasts: Role of nutrients. **Journal of Applied Bacteriology** 34 (1): 161-171, 1971.

WALKER G. M.; MCLEOD A. H. e HODGSON V. J. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters** 127 (3): 213–22, 1995.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S. e TAYLOR, J. Genetics and evolution: Amplification and direct sequencing fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to Methods and applications. **Academic Press**, 1990.

WICKNER, R. B. Chromosomal and nonchromosomal mutations affecting the "*Killer* character" of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 76 (3): 423-432, (1974a).

WICKNER, R. B. "*Killer* character" of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature. **Journal of Bacteriology** 117 (3): 1356–1357, (1974b).

WICKNER, R. B. *Killer* of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. **Bacteriological reviews** 40 (3): 757–773, (1976).

WICKNER, R. B. The *killer* double-stranded RNA plasmids of yeast. **Plasmid** 2 (3): 303-322, 1979.

WICKNER, R. B. Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological reviews** 60 (1): 250–265, 1996.

WINTER, G.; HENSCHKE, P. A.; HIGGINS, V. J.; UGLIANO, M. e CURTIN, C. D. Effects of rehydration nutrients on H₂S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast v13. **AMB Express** 1: 36, 2011.

WLODARCZYK, S. R.; CANOSSA, S.; SOUZA, R. C. e SILVA, G. A. Comparação dos meios YEPD e LORENA/ELNC (80:20) quanto à resposta *killer*. **10º Encontro**

de Iniciação Científica e 6º Encontro de pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Página 59, 2012a.

WLODARCZYK, S. R.; SOUZA, R. C. e SILVA, G. A. Detecção de presença e avaliação do comportamento *killer* de leveduras isoladas na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS). **II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos.** 2012b.

WLODARCZYK, S. R.; BONFIM, T. M.; BRAND, D.; AGUSTINI, B. C. e da SILVA, G. A. Caracterização de leveduras provenientes do município de Pinto Bandeira (RS) e da região metropolitana de Curitiba (PR) para a elaboração de vinhos. **Mestrado realizado no centro nacional de pesquisa de uva e vinho – Embrapa.** Universidade Federal do Paraná, 2013.

WLODARCZYK, S. R., de SOUZA, R. C., BONFIM, T. M., BRAND, D. and da SILVA, G. A. Evaluation of isolated yeasts from grapes of Pinto Bandeira region, Bento Gonçalves (RS) in relation to production of H₂S and fermentation rate. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports** 11 (2): 24-27, 2012b.

WOODS, D. R. & BEVAN, E. A. Studies on the Nature of the *killer* Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of general microbiology** 51 (1): 115-126, 1968.

YOUNG, T. W. & YAGIU, M. A comparison of the *killer* character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek** 44 (1): 59–77, 1978.

ZAGORC, T.; MARÁZ, A.; CADEZ, N.; POVHEJEMEC, K.; PÉTER, G.; RESNIK, M.; NEMANIC, J. and RASPOR, P. Indigenous wine *killer* yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology** 18 (4): 441-451, 2001.

ZHU, H. & BUSSEY, H. The k1 toxin of *Saccharomces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. **Applied and Environmental Microbiology** 55 (8): 2105-2107, 1989.

ANEXOS

ANEXO A - Meios de Cultura

1. Meio Mosto Ágar

Fase	Componente	Quantidade
A	Extrato de levedura	10 g
A	Mosto	250 mL
A	Água destilada	250 mL
B	Ágar	20 g
B	Água destilada	500 mL

As fases do meio foram preparadas separadamente e esterilizadas em autoclave (FABBE – modelo 104), a 121°C durante 30 minutos.

2. Meio Mosto Sulfito

Componente	Quantidade
Sulfito de sódio	1,0 g
Triptona	10 g
Mosto de uva Lorena	1000 ml

O meio sulfito foi esterilizado após seu término durante 30 minutos em autoclave a 121°C (FABBE – modelo 104) a fim de evitar contaminações e conseqüentemente, consumo dos nutrientes com microrganismos indesejados.

3. Meio Ágar Mosto Lorena/ELNC 80:20.

Fase	Componente	Quantidade
A	Mosto de uva Lorena	800 mL
A	Azul de metileno 0,5%	12 mL
B	Extrato de levedura não comercial (ELNC*)	188 mL
B	Ágar	10 g

O pH do mosto foi ajustado através do equipamento Orion Sar A211 pHmeter para 4,5 e do ELNC para 6,5. As fases foram preparadas separadas e esterilizadas em autoclave a 121⁰C separadamente durante 30 minutos.

ANEXO B - Composição da reação de PCR

Reagentes	Volume (1x)
Água ultra-pura	12,2 µL
Tampão <i>Taq</i> DNA Polimerase + MgCl ₂	5,0 µL
dNTPs	4,5 µL
Primer ITS 1	1,0 µL
Primer ITS 4	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,3 µL
DNA amostral	1,0 µL

A composição da reação foi calculada para se obter um volume final de 25 µL.